



TITLE:

# 低酸素環境適応の骨格筋の組織化学的解析( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

岡本, 啓

---

CITATION:

岡本, 啓. 低酸素環境適応の骨格筋の組織化学的解析. 京都大学, 2000, 博士(人間・環境学)

ISSUE DATE:

2000-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3167416>

RIGHT:

# 低酸素環境適応の骨格筋の 組織化学的解析

岡 本 啓

低酸素環境適応の骨格筋の  
組織化学的解析

岡 本 啓

# 目 次

	頁
緒 言	
生体の環境適応能研究の意義 .....	1
序章	
研究小史 ―筋線維タイプとその変化― .....	4
1 筋線維タイプの分類 .....	4
2 筋線維の可塑性と運動トレーニング .....	9
3 筋線維タイプを変化させる要因 .....	11
4 低酸素環境下にみられる筋線維タイプの変化 .....	12
第1章	
低圧環境下に生育したラットのヒラメ筋筋線維組成の特性 .....	14
1. 1 材料と方法 .....	15
1. 2 結果 .....	18
1. 3 考察 .....	23
第2章	
低圧環境曝露と持久性運動負荷に対する骨格筋線維の応答 .....	29
2. 1 材料と方法 .....	30
2. 2 結果 .....	33
2. 3 考察 .....	41
第3章	
変動低酸素環境と持久性運動負荷に対するヒラメ筋の応答 .....	47
3. 1 材料と方法 .....	48
3. 2 結果 .....	51
3. 3 考察 .....	53



	頁
第4章	
低圧環境への急性適応期における筋線維組成の経時的変化 .....	57
4. 1 材料と方法 .....	59
4. 2 結果 .....	61
4. 3 考察 .....	71
第5章	
低圧環境下における運動トレーニングの至適低圧度 .....	81
5. 1 材料と方法 .....	81
5. 2 結果 .....	83
5. 3 考察 .....	84
第6章	
総合考察 ―環境適応の筋生理学― .....	89
6. 1 骨格筋の低酸素環境適応の特性 .....	89
6. 2 筋線維に対する低酸素ストレスと甲状腺ホルモン作用との関係…	92
6. 3 結語 ―今後の環境適応能研究の方法― .....	94
参考文献 .....	98
謝 辞	
付 録      関連論文（4編）	

## 略 語

- ATP, adenosine 5'-triphosphate (アデノシン 5'-三リン酸)  
ATPase, adenosinetriphosphatase (アデノシントリホスファターゼ)  
BW, body weight (体重)  
CK, creatine kinase (クレアチンキナーゼ)  
CS, citrate synthase (クエン酸合成酵素)  
CSA, cross-sectional area (横断面積)  
DNA, deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)  
DTT, dithiothreitol (ジチオトレイトール)  
EDL, extensor digitorum longus (長指伸筋)  
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)  
FG 線維, fast-twitch glycolytic fiber (速収縮性解糖線維)  
FOG 線維, fast-twitch oxidative glycolytic fiber (速収縮性酸化的解糖線維)  
FT 線維, fast-twitch fiber (速筋線維)  
 $\alpha$ -GPD,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase  
( $\alpha$ -グリセロリン酸脱水素酵素)  
HAD, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase  
(3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素)  
Hb, hemoglobin (血色素)  
Hct, hematocrit (赤血球容積比)  
HK, hexokinase (ヘキソキナーゼ)  
HSP, heat shock protein (熱ショックタンパク質)  
INT 線維, intermediate fiber (SO 線維と FOG 線維の中間タイプの筋線維)  
IRMA, immunoradiometric assay (放射性免疫測定法の一つ)  
IU, international unit (酵素の国際単位)  
LDH, lactate dehydrogenase (乳酸脱水素酵素)  
MHC, myosin heavy chain (ミオシン重鎖)  
mRNA, messenger ribonucleic acid (伝令 RNA)  
NAD, nicotinamide adenine dinucleotide  
(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)  
NBT, nitro blue tetrazolium (ニトロブルーテトラゾリウム)  
O.D., optical density (光学的濃度)  
PFK, 6-phosphofructokinase (6-ホスホフルクトキナーゼ)  
RBC, red blood cell (赤血球)  
RIA, radioimmunoassay (放射性免疫測定法)

**SDH, succinate dehydrogenase** (コハク酸脱水素酵素)

**SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**

(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

**SO 線維, slow-twitch oxidative fiber** (遅収縮性酸化的線維)

**ST 線維, slow-twitch fiber** (遅筋線維)

**T<sub>4</sub>, thyroxine** (サイロキシン)

**T<sub>3</sub>, triiodothyronine** (トリヨードサイロニン)

**TSH, thyroid-stimulating hormone** (甲状腺刺激ホルモン)

## 緒 言

### 生体の環境適応能研究の意義

生物とは生命を有するものの謂いであり、生物を他の物質と区別する際立った特徴は、生長、増殖、分化、代謝、運動などの生命活動に由来する。しかしながら、生命とは何か、という問いに対して直截な解答を与えることは頗る困難である。そのため自然科学では、生命とは何か、という命題に対して、専ら生物に生起する生命現象を研究対象として取り扱い、物理的・化学的手法を応用して生命現象を視覚化・計量化することによって生命の基本的性質の理解を試みる。これに関して、デュボス (Dubos, R.) は「今日でも、生命を絶対的な概念で定義することはできないが、生命がプロセスとして必ずもっている現象をとらえることは、そうむずかしくはない。生まれおちてから死ぬまでの一生は、生体が自分をつくりあげて保存するための、環境に対する数限りない反応の連続である」と端的に述べている [デュボス・田多井訳, 1977]。

生体は複雑な構成要素から成り立っているが、生体内の構造をそこに働く機能との関連において整理し、生体全体におよぶ統一した合理性を見い出すことによって生体内に生起する生命現象を解明しようとする立場が生理学である。特に生物が環境に対して示す適応現象を扱う分野は、環境生理学または適応生理学と呼ばれる。歴史的にみて、生理学上の重要な概念や有力な方法論は、環境生理学の立場から得られた知見にもとづくものが数多く存在する。

例をあげると、西洋医学の源流と位置づけられる古代ギリシャのヒポクラテス (Hippokrates) の学派より伝わる「自然治癒力」という概念 [小川訳, 1963]、近代実験生物学の先駆者として知られるベルナール (Bernard, C.) が提唱した生物の「内部環境」における物理化学的關係を解明するという生物学上の方法論 [ベルナール・三浦訳, 1970]、キャノン (Cannon, W.B.) の「ホメオスタシス (homeostasis)」の概念 [キャノン・館ら訳, 1981]、現代ではセリエ (Selye,

H.) の「ストレス」学説 [セリエ・杉ら訳, 1988] などが有名である。これらの重要な生理学的概念や方法論は、生体と環境要因との間に生起する現象を解明する中で確立されてきたものである。

1953 年に Watson, J.D. と Crick, F.H.C. によって発表されたデオキシリボ核酸 (DNA) の二重らせん構造モデル以後 [Watson and Crick, 1953]、生命現象は DNA をはじめとする分子レベルでの物質の動態の探究、すなわち分子生物学という手法での記述が可能となり飛躍的な発展を遂げた。現代の分子生物学の発展は、生命現象を遺伝子に始まる物質の物理化学の法則によって説明し、またヒトと他の生物との生理的・生化学的メカニズムに根源的な相違を認めず、人類の生命観に大きな転換を与えることとなった。

しかしながら、あらゆる生命現象は遺伝子が全てを決定するのではなく、実際には環境因子が大きく関与している。例えば生物の発生の初期段階において、受精卵が細胞分裂を開始して次第に細胞が分化する過程には、重力や細胞の相互作用によって細胞分裂時に生じる非対称性という偶然的な要因が決定的な影響を及ぼす。この事実が示唆する重要性について、多田富雄は「受精卵に含まれている遺伝子の総体、すなわち「ゲノム」は、個体の生命活動の設計図のすべてを含んでいるが、その設計が実現されてゆく過程には、環境からの働きかけや偶発的な事象、すなわち「後成的」な現象が多く含まれる」、「DNA はすべてを前もって決定していたのではない。偶然や後天的な経験を通して、生物は DNA の利用の仕方を変え、遺伝子を異なった文脈で読みかえるようになる」と述べ、生命現象の特質は遺伝子プログラムが偶発的な環境要因をも取り込んだ「超システム」にあり、これが生物の示す柔軟な適応性の根幹になっていると説明する [多田, 1997]。

以上に記したように、生命現象を理解する上で、生体が環境要因に対していかに反応し、いかなるメカニズムが作動しているのかということの究明が、遺伝子レベルから細胞、個体さらには生物集団のレベルに至るまで、最も根幹に横たわる問題であると考えられる。

本論文の研究テーマは、骨格筋という一部の器官における環境変化に対する反

応というごく限られた生命現象についてではあるが、それに臨む態度はこれまでに概観したような生命現象に対する歴史的な認識や研究方法を踏襲したものである。これまでに携わった研究の中には、重力負荷の減少状態や多量の放射線への曝露など、通常では生体が遭遇しがたい環境要因を取り上げて、骨格筋の変化を観察したものが含まれる〔田口ら, 1994; 岡本ら, 1996〕。そのような非日常的な環境に対して生体が如何なる適応能を有するかを探究することは、生命現象に関わる知見を得る上での有力な一方法といえる。

19世紀ロシアの作家ドストエフスキー (Dostoevskii, F.M.) は「私は現実というものについて独特の見方をされていて、多くの人がほとんどファンタスチックで、例外的と呼んでいるものが、私にとってはどうかすると現実的なもののいちばんの本質をなすことになるのです」と記している〔ドストエフスキー・江川訳, 1980〕。例外的と思われる事象の中に現実の普遍的な本質が表出するという事例は、芸術・創作活動に限ったことではなく、自然科学の領域においても看取できることである。近年の生理学領域に関していえば、スペースシャトルに代表されるように、地球環境を離れた宇宙空間における生体反応の観察結果は、生体に潜在する適応機構を探る上で新たな知見をもたらした典型的な事例といえる〔宇宙開発事業団, 1998〕。

本論文は、生体の環境適応能研究のうち、生体の物質代謝に不可欠な物質である酸素の不足した低酸素環境下において生体がいかなる反応を示すのかを、主に骨格筋を対象にして解析をおこなったものである。生体の環境適応能を探ることは生命現象の特質を明らかにするための有力な方法であり、「自然と人間との共生」という理念のもとに「人間と環境との新しいかかわりを模索し」「人間と環境の相互関係にふれる」人間・環境学の分野〔人環フォーラム編集委員会, 1998〕に重要な一画を占めるものと確信し、ここに研究成果を報告する。

## 序 章

### 研究小史 ―筋線維タイプとその変化―

骨格筋は生物の身体運動を担うために分化した筋細胞を主成分とする組織である。筋細胞は細長い多核の細胞であり、筋線維とも呼ばれる。骨格筋はこの細長い筋線維が長軸方向に並んで形成されている。筋線維は長軸方向に収縮するため、骨格筋では筋線維の収縮の和が力となって発揮され、身体運動として表出される。

筋線維の大きな特徴は、まず第一にこの収縮機能にあり、収縮活動に必要なエネルギーを供給する代謝機能とは密接な関係を有する。この収縮機能と代謝機能の微妙な差違によって、収縮速度や持続時間などに異なった特性を持つ種々のタイプの筋線維が存在する。それらの多様なタイプの筋線維が混在することで、複雑な身体運動の発揮が可能となっている。

第二の特徴として、筋線維は自らの構造と機能を変化させる能力、すなわち可塑性に富んでいる。運動の様式や活動量、栄養状態、ホルモンレベルなどの様々な身体内外の環境変化に対応して、筋線維が合目的的とみられる変化、すなわち適応性を示す。人体の場合、骨格筋の湿重量は体重の 40～50% の多きを占めるが〔伊藤と黒島, 1992〕、個体の生活習慣に適応した骨格筋の発達がその体型からも看取できることは日常経験されるところである。

本論文は、骨格筋が示す環境適応能を構造と収縮・代謝特性の変化から解析しようとするものである。骨格筋の収縮・代謝特性は、骨格筋を構成する筋線維の組成比率に最も特徴的に現れる。そこで本章では、筋線維の特性を理解するために筋線維のタイプ分類を整理するとともに、筋線維タイプに変化を引き起こす要因に関する先行研究の流れを概観して、本研究における問題意識の所在を記す。

#### 1 筋線維タイプの分類

筋線維は、肉眼での観察から赤味の強い赤筋と白っぽい透明感のある白筋に古

くから区別されていたが、19 世紀後半には両者の収縮特性に差異のあることが認識されていた [Ranvier, 1874]。すなわち、赤筋は収縮速度が遅く張力も比較的弱い、数十分以上にわたる持続的な収縮が可能である。他方、白筋は収縮速度が速く張力も強いが、持続性に欠け疲労しやすい。両者の収縮特性の区別によって、赤筋は遅筋、白筋は速筋とも称された。後に筋の色調の違いは筋に含まれるミオグロビン量の多寡によるもので、収縮速度の差違と直接対応する因子ではないことが明らかになったため、筋線維タイプを大別する場合に現在では遅筋、速筋の名称を用いるのが一般的となっている。

1960 年代から 70 年代にかけて、哺乳類の筋線維を組織化学的手法を用いてタイプ分類する研究が盛んに行われた。これらの研究の多くは、筋を急速凍結して作成した連続横断切片に種々の酵素染色を施し、酵素活性の差異を呈色反応で示すことによって筋線維の特性を区分しようとするものであった。これらの組織染色法のうち、筋線維のタイプ分類のため現在最も頻繁に使用される酵素染色は、ミオシン・アデノシントリホスファターゼ (myosin adenosine-triphosphatase; ATPase) 染色、コハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase; SDH) 染色および  $\alpha$ -グリセロリン酸脱水素酵素 ( $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase;  $\alpha$ -GPD) 染色である。

ATPase 染色は、生体内のエネルギー伝達物質であるアデノシン 5'-三リン酸 (ATP) が加水分解される際に生じるリン酸イオン ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) に、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を結合させ、次いでコバルトイオン ( $\text{Co}^{2+}$ ) に置換して、硫化アンモニウムとの反応 (硫化コバルト) で着色させる。その結果、ATPase 活性のある部分は黒色または濃灰色を呈し、活性のない部分は着色せずほぼ透明となる。ATPase 染色を施す前段階にアルカリ性あるいは酸性の緩衝溶液で前処理を行うと、筋線維の ATPase 活性に違いが生ずる。この反応差異を利用して、Brooke と Kaiser は筋線維の ATPase における pH 感受性を詳細に検討して筋線維を分類した [Brooke and Kaiser, 1970a, 1970b]。これによると、アルカリ前処理によって ATPase を失活する筋線維を type I、酸性前処理によって失活するものを type II に大別する。type II には、サブタイプとして type II A、type II B を、



さらにアルカリおよび酸の双方の前処理によっても失活しない type II C を加えて、全部で4種類に分類した。また Barnard らは齧歯類骨格筋を用いて ATPase 染色による組織化学的特性と生理学的な収縮特性との関連を調べ、type I 線維が遅筋 (slow-twitch; ST) 線維、type II 線維が速筋 (fast-twitch; FT) 線維であることを明かにした [Barnard et al., 1971]。筋線維を構成する主要タンパク質であるミオシン (myosin) には ATPase の活性部位があり [Lowey et al., 1993]、ミオシンによる ATP の加水分解速度と筋線維の収縮速度の間には相関関係のあることが知られている [Barany, 1967]。これらの研究結果から、ATPase 染色は組織化学的に筋線維の収縮特性を知ることが可能であるという利点から、筋線維のタイプ分類に最も重要な染色手法となっている。なお、アルカリまたは酸による前処理によって ATPase 染色パターンが変化する仕組みについてはいまだに十分には明かになっていないが、直接的には前処理液の pH の影響ではなく、含まれるイオンが ATPase 活性部位であるミオシンの重鎖部分 (myosin heavy chain; MHC) に作用し、それぞれのミオシン分子種ごとに特異的な構造変化をおこすためであると考えられている [Matoba et al., 1985]。

SDH と  $\alpha$ -GPD は酸化還元酵素であり、これらの染色には発色剤として nitro blue tetrazolium (NBT) が用いられている。NBT は脱水素反応時に水素受容体として働き、還元されて青紫色あるいは赤紫色の不溶性着色化合物 (フォルマザン; formazan) を形成する。NBT を用いると、フォルマザン顆粒は 5 nm 以上には成長せず、細胞質内に拡散することがほとんどないため、脱水素酵素活性部位との特異性の高いことが最大の利点である [Nachlas et al., 1957; Wattenberg and Leong, 1960]。

SDH はミトコンドリア内膜に存在し、クエン酸回路においてコハク酸を酸化してフマル酸を生成するとともに、電子伝達系のフラビンタンパク質に水素を転移する反応を担う。したがって、SDH 染色は筋線維の酸化系代謝能の指標として用いられる。特に、SDH 染色によって形成されたフォルマザン顆粒はミトコンドリア特異性が強く、筋線維内のミトコンドリア分布を反映するため重要な染色方法である。



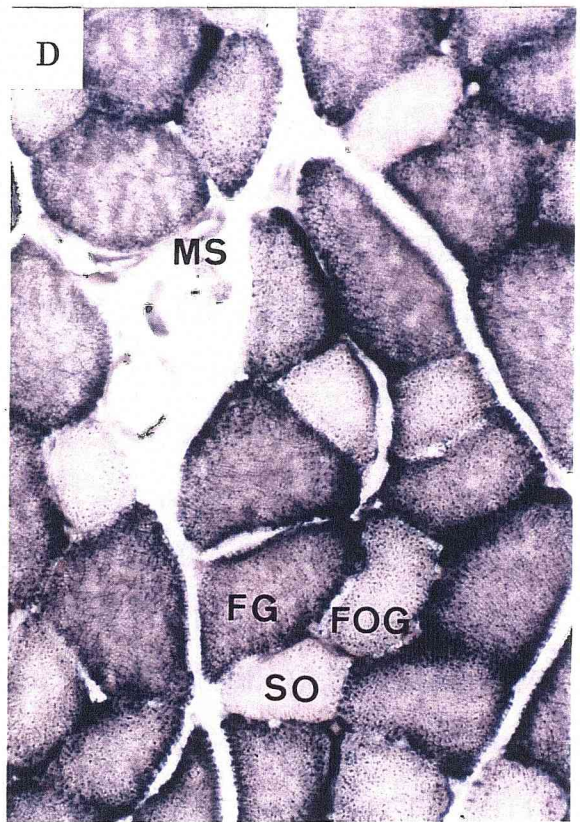
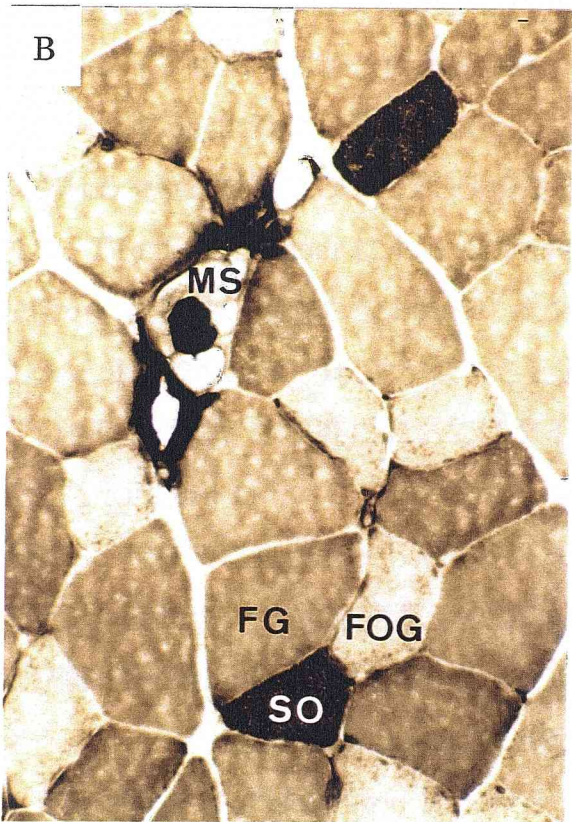
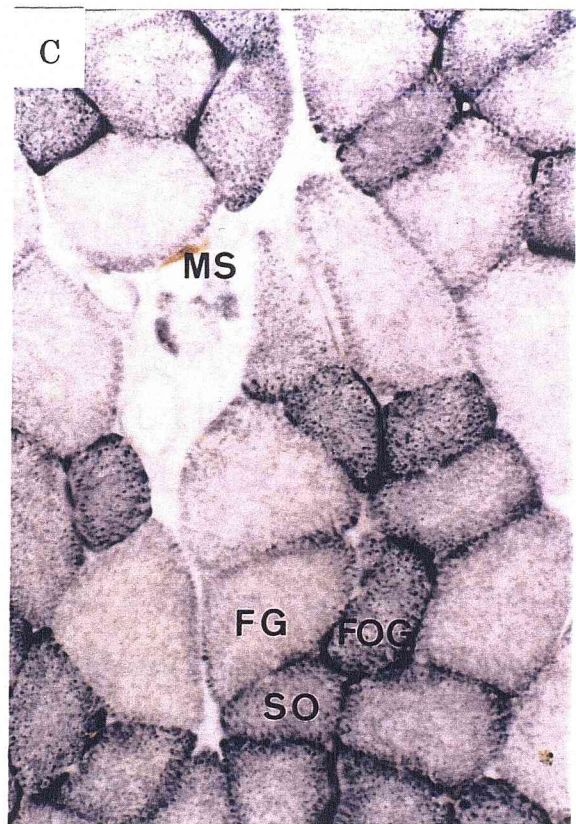
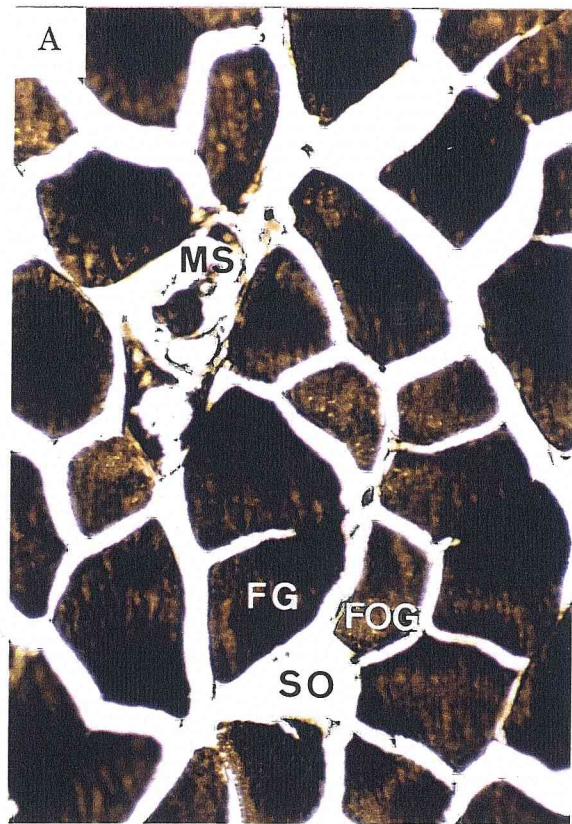


Figure 1. Serial cross sections of the rat extensor digitorum longus muscle stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), ATPase preincubated at pH 4.5 (B), succinate dehydrogenase (C), and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (D). MS, muscle spindle; SO, slow-twitch oxidative fiber; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic fiber; FG, fast-twitch glycolytic fiber. Scale bar = 50  $\mu$  m.



$\alpha$ -GPD も SDH と同じくミトコンドリア内膜にあって、グリセロールリン酸シャトルの反応経路に関わる。 $\alpha$ -GPD は  $\alpha$ -グリセロリン酸を酸化して解糖系の中間体のひとつであるジヒドロキシアセトンリン酸を生成して細胞質に放出するため、 $\alpha$ -GPD 染色は筋線維の解糖系代謝能の指標として用いられる。

SDH 染色および  $\alpha$ -GPD 染色は、筋線維の代謝特性を明瞭に反映するため、収縮特性を表す ATPase 染色とともに使用されてきた。Peter らはそれまでの筋線維タイプの分類方法を検討し、収縮特性 (ATPase 活性)、酸化能力 (SDH 活性) および解糖能力 ( $\alpha$ -GPD 活性) の 3 指標から筋線維を slow-twitch oxidative (SO)、fast-twitch oxidative glycolytic (FOG)、fast-twitch glycolytic (FG) の 3 タイプに分類する方法を提唱した [Peter et al., 1972]。

Brooke と Kaiser による分類と Peter らによる分類は、速筋線維 (type II) のサブタイプにおいて若干の差異が認められるが、概ね type I と SO、type II A と FOG、type II B と FG がそれぞれに対応する。また、ヒラメ筋にしばしば観察される type II C は SO と FOG の中間タイプ (intermediate; INT) に分類される。Brooke と Kaiser による ATPase 染色法では、酸性前処理液の温度や pH のほか、緩衝液の組成や含まれるイオンの種類などの微妙な影響を受けて、type II A と II B の区分の再現性が低いこと [Mabuchi and Sreter, 1980; Gollnick et al., 1983] から、本研究においてはタイプ分類の確実な Peter らの分類方法を採用した (Figure 1)。

なお、現在では主にラットやマウスなどの齧歯類の筋を用いた研究によって、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による分離 [Bar and Pette, 1988] や、モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色パターンによる同定 [Schiaffino et al., 1989] から、ミオシン重鎖には type I、type II A、type II B および type II X の 4 種類のアイソフォーム (isoform) の存在することが明かとなっている。和田と勝田は従来の研究報告から筋線維タイプとミオシン重鎖アイソフォームとの関係を照合し、ミオシン重鎖の種類のうち type I、type II A、type II B は Brooke と Kaiser による筋線維タイプ分類の同名称のものに発現しており、type II X は従来の ATPase 染色では主に type II B とし

て分類されている筋線維の一部に含まれていること、また Brooke と Kaiser の分類による type II C はミオシン重鎖アイソフォームの type I と type II A の混在型であるとしている [和田と勝田, 1995]。このような筋線維の特性については、Peter らの分類法を基準として Table 1 に整理した。

Table 1. Fiber type characteristics in the rat skeletal muscle

Fiber type				
by Peter et al., 1972	SO	INT	FOG	FG
by Brooke & Kaiser, 1970	I	II C	II A (, II B)	II B
Myosin heavy chain isoform	I	I, II A	II A (, II X)	II X, II B
Contractile speed	slow	intermed.	fast	fast
Fatigue resistance	high	intermed.	intermed.	low
ATPase stain reaction				
(pH10.3-10.6)	low	intermed.	high	high
(pH4.5-4.6)	high	high	low	intermed.
(pH4.1-4.3)	high	intermed.	low	low
Oxidative enzyme activity				
(SDH stain reaction)	high	high	high	low
Glycolytic enzyme activity				
( $\alpha$ -GPD stain reaction)	low	intermed.	high	high

SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; FG, fast-twitch glycolytic; INT, intermediate between SO and FOG; ATPase, adenosine-triphosphatase; SDH, succinate dehydrogenase;  $\alpha$ -GPD,  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase.

## 2 筋線維の可塑性と運動トレーニング

骨格筋では筋力トレーニングによって肥大が生じ、逆に骨折などの傷害に際しての不動固定処置によって萎縮が生じる。このように、筋が活動量の増減に対応して柔軟・迅速な可塑性を示すことは日常的に観察される。

筋線維のタイプ分類が ATPase 染色やその他の代謝特性を示す染色方法の確立

によって可能になると、筋線維タイプの混在する比率（筋線維組成）が筋の種類によって異なることが明らかとなり、筋線維組成がその筋の特性や運動パフォーマンスを反映する有力な指標となった。そこで運動生理学の分野では、運動トレーニングによって筋線維タイプを変化させることができるのか否かは大きな関心事であった。

Bagby らはラットの腓腹筋を用いて持久性トレーニングとスプリントトレーニングが筋線維組成に及ぼす影響を検討しているが、筋線維タイプには変化を認めなかった [Bagby et al., 1972]。Gollnick らや Costill らはヒトの外側広筋についてトレーニングの影響を報告しており、トレーニング後には筋線維の肥大がみられるほか、酸化系酵素である succinate dehydrogenase (SDH) や解糖系酵素である 6-phosphofructokinase (PFK) などの酵素活性に上昇を認めているが、筋線維タイプの組成比率には変化を認めなかった [Gollnick et al., 1973; Costill et al., 1979]。

Komi らは双生児同士の外側広筋の筋線維組成を比較した結果、一卵性双生児が二卵性双生児よりも強い類似性のあることを見い出した。双生児の筋線維組成のデータから量的形質の表現型分散を算出したところ、広義の遺伝率が男子で 99.5%、女子で 92.2% となり、筋線維組成に及ぼす遺伝的な影響が身長 (95%) や体重 (90%) と同程度以上に大きいことを示した [Komi et al., 1977]。

これらの研究結果から、筋線維組成は遺伝的な影響が強く、運動トレーニングによって後天的に変化させることは極めて困難であると考えられた。

一方で、Buller らによる遅筋と速筋を支配する神経の交叉実験 [Buller et al., 1960, 1969] や、Burke のおこなった筋を支配する運動神経の同定実験 [Burke, 1967, 1973] によって、神経・筋単位（運動単位）が分類され、筋の収縮特性が支配運動神経の興奮様式と関連していることが明かになった。Scammon の成長曲線で知られるように、神経系は成長の早期段階に発達・成熟すること [Harris et al., 1930]、また成熟後は神経終末部や脊髄レベルでのシナプス結合の可塑性が比較的低いこと [Tuffery, 1971; Mendell et al., 1976] などから、筋線維を支配する運動神経は後天的な影響を受けにくいと考えられた。したがって、これら

の研究結果は、運動トレーニングでは筋線維タイプが変化しないことに対する強力な論拠となっていた。

運動トレーニングが筋線維組成に与える影響は、Gollnick らや Costill らの報告 [Gollnick et al., 1973 ; Costill et al., 1979] の後にも、トレーニング様式や強度、期間を変えて研究されてきた。Green らは持久性トレーニングによってラット足底筋で type II A 線維比率の増加と type II B 線維比率の減少を認め [Green et al., 1984]、また Jansson らはスプリントトレーニングによってヒトの外側広筋で type II A 比率の増加と type I 比率の減少を認めている [Jansson et al., 1990]。しかしながら運動トレーニングによって筋線維組成に有意な変化を認めた報告は、多くの場合が速筋線維である type II 線維のサブタイプ間の組成比率の増減であり、収縮特性を大きく異にする速筋 (type II) と遅筋 (type I) の間でのタイプ移行を認めた報告は、Jansson らの報告以外にほとんどない。

これらの研究結果から、運動トレーニングによって筋横断面積や筋線維の代謝特性には適応性の変化が生じ、筋線維タイプについては速筋線維 (type II) のサブタイプ間に移行は認められるが、収縮特性の質的变化を伴うような type I と type II の間に筋線維のタイプ移行が生じることは極めて困難であるというのが、現時点での一般的な見解となっている [的場ら, 1995 ; 和田と勝田, 1995]。

### 3 筋線維タイプを変化させる要因

前節で記したように、骨格筋の筋線維タイプを運動トレーニングといった後天的な条件で変化させることは大変に困難であるが、筋線維の収縮・代謝特性を決定していると考えられる要因を変化させることで、筋線維のタイプ移行が認められたことが報告されている。

前述した Buller らがおこなった遅筋と速筋の支配神経を交叉させること [Buller et al., 1960 ; Barany and Close, 1971]、あるいは長期間にわたって支配神経インパルスとは異なる神経刺激頻度を電氣的に加えること [Pette et al., 1973 ; Salmons and Sreter, 1976] によって、遅筋タイプから速筋タイプ、または速筋タイプから遅筋タイプへの転換の生じることが認められている。

また、無重力環境の地上モデルとして、ラットなどの実験動物の後肢骨格筋にかかる体重負荷を尾懸垂や体懸垂などの処置によって極度に減少させた場合、ヒラメ筋などの姿勢保持に働く抗重力筋では筋線維に遅筋タイプから速筋タイプへの移行がみられる [Corley et al., 1984; Desplanches et al., 1987]。

薬理的な方法としては、甲状腺ホルモンの過剰投与 [Iannuzzo et al., 1977; Nicol and Bruce, 1981; Fitzsimons et al., 1990] やアドレナリン $\beta$ 受容体の作動薬である clenbuterol の投与 [Zeman et al., 1988] によって、長指伸筋やヒラメ筋では速筋線維比率の増加することが報告されている。また、去勢処置や性ホルモンであるテストステロンの投与実験から、テストステロンが筋線維組成の雌雄差に関与し、速筋線維の増加に作用するという報告が認められている [Vaughan et al., 1974; Krotkiewski et al., 1980]。

#### 4 低酸素環境下にみられる筋線維タイプの変化

従来報告された筋線維タイプに変化を認めた実験は、前節に記したように物理的あるいは薬理的処置によって、通常の生理的変動の範囲から相当に逸脱した変化を生体に強いるものであった。

ところが Taguchi らは、高度 4,000 m に相当する低圧性低酸素環境と水泳運動を組み合わせ、いわゆる高所トレーニングのモデル実験を 5 週間実施した後に、ラットのヒラメ筋において SO 線維の減少と FOG 線維の増加、および長指伸筋と足底筋に FG 線維の減少と FOG 線維の増加を認め、低圧環境への曝露が筋線維に特異的なタイプ移行を引き起こす可能性を示唆した [Taguchi et al., 1985]。

Sillau と Banchemo は、高度 5,100 m に相当する酸素濃度で 45 日間飼育したラットのヒラメ筋には変化はなく、腓腹筋と前脛骨筋の速筋線維のサブタイプ間の比率に差が認められたとする報告をしており [Sillau and Banchemo, 1977]、筋線維組成に及ぼす低酸素の影響に関して、Taguchi らが示したような遅筋タイプから速筋タイプへの移行は従来他に認められていなかった。したがって、生理的適応が十分に可能である常住可能な程度の低酸素環境への曝露によって生ずる筋線維タイプの変化に関しては、運動トレーニングでみられるものと同じく速筋

線維のサブタイプ間での移行であり、遅筋線維と速筋線維間にタイプ移行が生じるとは考えがたいというのが大方の見解であった。

唯一、Hildebrand らは慢性的な低酸素血状態にある肺疾患患者の大腿四頭筋の筋線維組成が健常者と比較して type II 線維比率の大きいことを報告した中で、Taguchi らが示したような生体内の低酸素状態が、遅筋線維から速筋線維へのタイプ移行を引き起こす可能性のあることを間接的に支持した [Hildebrand et al. 1991] 。

本章において概観したような筋線維タイプの可塑性に関する研究報告を踏まえ、本研究における一連の実験は、Taguchi らが示した低酸素環境下における生理的適応により、骨格筋の筋線維タイプに特異的な移行、特に収縮特性を異にする遅筋タイプから速筋タイプへの移行が発現するかを確認し、その生理的意味を解析することを目的としておこなわれたものである。



## 第 1 章

### 低圧環境下に生育したラットのヒラメ筋筋線維組成の特性

我々が平地においては通常強く意識することのない大気の存在も、高所滞在時には生理的反応として実感することとなる。高山病ともいわれる急性高所障害は気圧の低下に伴う酸素濃度の減少に起因し、3,000 m を超える高度から発症することが多くなる〔万木, 1987〕。高所滞在中、生体内では低酸素状態によって引き起こされた高所障害を緩和すべく、適応機構が働いて生体の活動を維持する。人類は高度 8,000 m を超える高峰への登頂を酸素補給なしでも達成し、平地の酸素分圧の 30~35% 程度にまで低下した低酸素環境にも耐えうることを示したが、常住することが可能な高度となると、5,200~5,300 m（平地の酸素分圧の約 50%）が限界といわれている〔佐藤, 1981〕。

常住可能な程度にある低酸素環境に対して、生体の生理的順応の段階は急性適応（代償性反応）期とその後に現れる慢性適応（馴化）期に大きく区分される。低圧環境への適応の進行は、生体全体に一樣の速度で現れるのではなく、器官・組織によって異なる。低圧曝露後、心拍数は一旦上昇するが数日間で通常に復する。換気量は 1 週間程度、血中のヘモグロビン濃度は約 2 週間まで増加し、その後減少に転じて次第に安定化する〔浅野, 1991 ; 黒島, 1993〕。したがって、生体内の酸素運搬に関わる呼吸・循環系では、急性適応期の目安を 2 週間程度とみるのが一般的である。

低圧環境に対して、酸素需要の大きい筋組織が急性適応を果たすまでに要する期間は明らかではない。低圧環境下でラット骨格筋の筋線維組成に変化を見出した Taguchi らは、5 週間の曝露期間を設定しており〔Taguchi et al., 1985〕、また Terblanche らは高度 1,750 m 相当の低圧環境にラットを 2 週間曝露した後に、腓腹筋の酸化系酵素活性に有意な増加を認めている〔Terblanche et al., 1984〕。これらの先行研究からラットを被験動物として用いた場合、骨格筋に生

じる適応性変化を組織化学的に捉えることが可能となる低酸素曝露期間は2～3週間程度と予測した。

そこで本実験では、低圧環境に曝露する期間に関して急性適応期に相当する実験群と慢性適応期に相当する実験群とを設定し、常圧環境にある対照群との比較を通じて骨格筋の低酸素適応を組織化学的に解析することを目的とした。

## 1. 1 材料と方法

### 1) 実験動物および飼育環境

実験動物にはストレス実験に頻用される Sprague-Dawley 系ラット（船橋農場）を採用した。筋線維組成に及ぼす遺伝的影響を抑制するため、一对の雌雄から生まれた同腹ラットを気圧環境条件の別に分離して飼育し、性成熟後に交配した後、各々の気圧環境下で生まれた仔ラットを使用して実験群を設けた。

低圧環境は 771 hPa（高度 2,200 m 相当）に設定した。この程度の低圧環境であれば、高所順応が十分に果たされ、高所障害を発症する恐れがないこと、かつ運動等の積極的な生活活動も可能であることによる [山地, 1992]。低圧環境はアクリル製低圧チャンバー内の空気を真空ポンプで吸引することによって人工的に創出した。低圧チャンバーへの空気流入量は約 12 l/min であった。対照とする常圧環境は高度 0 m 相当（1,011 hPa）の自然状態とした。

低圧環境下での交配によって生まれた仔ラットは、4 週齢時点で雌雄を別にし、そのまま低圧飼育を継続した。常圧環境下での交配によって生まれた仔ラットについても同様に雌雄を分けて、常圧飼育を継続した。

8 週齢時点で、低圧および常圧環境下で生育したラットを用いて雌雄別に以下の 4 群を設け、その後 2 週間飼育した。

SS 群：常圧環境下で生まれ、常圧飼育を継続した対照群（雄 6 匹、雌 6 匹）

SH 群：常圧環境下で生まれ、8 週齢まで常圧飼育を行い、8 週齢から 10 週齢までの 2 週間は低圧環境下での飼育に移行させた群（雄 6 匹、雌 6 匹）

HH 群：低圧環境下で生まれ、低圧飼育を継続した群（雄 3 匹、雌 6 匹）

HS 群：低圧環境下で生まれ、8 週齢まで低圧飼育を行い、8 週齢から 10 週齢までの 2 週間は常圧環境下での飼育に移行させた群（雄 3 匹、雌 6 匹）

これらの実験群により、低圧環境への急性適応期の反応を SH 群で、胎生期より低圧環境下において生育した慢性適応期の反応を HH 群で、さらに低圧環境への慢性適応期から常圧環境へ曝露した際の反応を HS 群で検討した。

飼育室内の温度は  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に設定し、食餌（船橋農場製固形飼料）と水は自由摂取とした。照明は 12 時間毎に点灯と消灯を繰り返した。なお給餌や清掃等のため、低圧環境下に飼育した群においては 1 日に 50～60 分程度は常圧環境に曝した。

本論文において、これより以下に記す全ての実験に関しては、動物実験の科学性と動物福祉の倫理を尊重し、日本生理学会制定の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」を遵守して遂行した〔日本生理学会, 1988〕。

## 2) 試料採取

10 週齢時点において、ペントバルビタール麻酔下（体重 100 g あたり 5 mg 使用）でヒラメ筋、心臓、左副腎を摘出し、湿重量を測定した。ヒラメ筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また腹大動脈より 4 cc 程度を採血した。

ラットのヒラメ筋は、出生時には全て type II C (INT) 線維で占められているが、生後 4～5 日より type I (SO) と type II A (FOG) に分化を始め、生後 30 日以降安定化する〔岡田ら, 1981〕。したがって 10 週齢時であればヒラメ筋線維の分化はほぼ収束したものとみなせる。

## 3) 血液学的分析

採取した血液は、血球計数器（Sysmex 社 NE-7000）を使用して、酸素運搬能力の指標となる赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（Hb）およびヘマトクリット値（Hct）を、それぞれシーフロー DC（直流）検出法、オキシヘモグロビン法および電気抵抗法によって測定した〔光田ら, 1990〕。

## 4) 組織化学的分析

凍結したヒラメ筋の筋腹部位から、クリオスタット (Leica 社 JUNG-CM1800) を用いて厚さ  $10\ \mu\text{m}$  の連続横断切片を作成し、ミオシン・アデノシントリホスフォターゼ (ATPase) 染色 [Brooke and Kaiser, 1970a] ならびにコハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色 [Nachlas et al., 1957] を施した。

ATPase 染色は、前処理として、 $0.1\ \text{mol}$ -グリシン・ $\text{NaCl}$ ・ $\text{CaCl}_2$ 水溶液に  $0.1\ \text{mol}$ - $\text{NaOH}$  を加えて室温で pH 10.3 から pH 10.6 に調整したアルカリ緩衝液と、 $1/7\ \text{mol}$ -バルビタールナトリウム・酢酸ナトリウム水溶液に  $0.1\ \text{mol}$ - $\text{HCl}$  を加えて室温で pH 4.1 から pH 4.6 に調整した酸性緩衝液を用いる。アルカリ前処理には室温で 15 分、酸性前処理には室温で 5 分程度、作成した切片をそれぞれの緩衝液に浸潤させた後、本染色を行う。本染色に用いるのは、アルカリ前処理に用いた  $0.1\ \text{mol}$ -グリシン・ $\text{NaCl}$ ・ $\text{CaCl}_2$ 水溶液と  $0.1\ \text{mol}$ - $\text{NaOH}$  を混合して室温で pH 9.4 から pH 9.6 に調整した緩衝液にアデノシン 5'-三リン酸 (ATP) ニナトリウムを  $3\ \text{mM}$  加えたものである。この本染色液に前処理を終えた切片を浸潤させて、 $37^\circ\text{C}$  で 45 分間震盪させる。その後、順に  $1\ \%$ - $\text{CaCl}_2$ 水溶液に 3 分、 $2\ \%$ - $\text{CoCl}_2$ 水溶液に 3 分、最後に  $1\ \%$ -硫化アンモニウム (黄色) 水溶液に 30 秒程度浸潤させると、ATPase によって加水分解されて生じた無機リン酸イオンの存在する筋線維が黒色または濃灰色を呈する。

SDH 染色は、 $0.1\ \text{mol}$ -第 1・第 2 リン酸ナトリウム緩衝液に  $0.1\ \text{mol}$ -コハク酸二ナトリウム水溶液を等量ずつ混合し、 $0.05\ \%$ -nitro blue tetrazolium (NBT) を加えて pH 7.4 から pH 7.6 に調整する。この染色液中に切片を浸潤し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間震盪させる。筋線維中の SDH 活性のある部分は、NBT が還元されて青紫色を呈する。

ヒラメ筋の筋線維タイプは Peter らの方法を用いて SO、FOG および INT の 3 タイプに分類し (Table 1 参照)、1 検体から 200~300 本の筋線維を無作為抽出して筋線維タイプ別組成比率を求めた [Peter et al., 1972]。なお、ラットのヒラメ筋では FG 線維はほとんど存在しない [Armstrong and Phelps, 1984]。

SDH 染色を施した横断切片からは、同定した SO 線維と FOG 線維を 1 検体から 20 本ずつ無作為抽出し、単一筋線維内の SDH 活性を測定した。SDH 染色は

序章に記したように、ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素活性部位を特異的に呈色させ、かつ沈着顆粒 (formazan) の拡散がほとんどないため、組織化学的に酸化系酵素活性とミトコンドリア密度の評価に利用することが可能である [Martin et al., 1985]。SDH 活性の測定は Bell らの方法に従い、一定光度下において顕微鏡 (日本光学社 Y2F-21) から取り込んだ SDH 染色切片の映像を、画像処理装置 (ピラス社 LA-535) とパーソナルコンピュータ (日本電気社 PC-9801RX) により指定した単一筋線維区画内の画像の全画素の輝度を 256 段階にデジタル化し、その平均値を単一筋線維の SDH 活性として相対的に評価し、吸光度で示した [Bell et al., 1992]。

## 5) 統計処理

データは全て平均値±標準偏差で示した。群間の平均値の比較には分散分析法を用い、有意水準を 5 % として統計処理を行った。

## 1. 2 結果

### 1) 体重および組織重量

8 週齢時ならびに 10 週齢時の体重とその間の体重増加率、および心臓、副腎、ヒラメ筋の湿重量と体重 100 g に対する各組織の湿重量の相対値を Table 1-1 に示した。8 週齢から 10 週齢までの 2 週間における体重の増加率は SH 群で有意に低下し、雄の平均値が 7 %、雌が 6 %にとどまった。一方、増加率が最大を示したのは HS 群であり、雄の平均値が 40 %、雌が 39 %であった。心重量の相対値は雄性の HH 群と HS 群では SS 群と比較してそれぞれ 16 %、26 %の増加がみられた。副腎重量の相対値は雄性の SH 群と HH 群で有意に増加し、それぞれ SS 群より 16 %および 30 %上回った。ヒラメ筋重量の相対値は雄性の HH 群で有意に高値を示し、SS 群や SH 群の平均値より 26 %増加した。体重および各組織の重量の全体的な傾向として、雄性に比較して雌性の方で群間の差が小さかった。

### 2) 血液性状

血液の酸素運搬能の指標となる赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値を Table 1-2 に示した。3 指標全てにおいて SH 群で雌雄ともに最高値を示し、

Table 1-1. Body weights, organ weights and soleus muscle weights

	SS	SH	HH	HS
<i>male</i>				
Body weights				
at 8wk-age, g	264±17	278±11	190±38 <sup>ab</sup>	260±14 <sup>c</sup>
at 10wk-age, g	321±27	297±16	259±40 <sup>a</sup>	362±8 <sup>abc</sup>
% increment	22±9	7±2 <sup>a</sup>	37±10 <sup>b</sup>	40±10 <sup>ab</sup>
Heart weights,				
mg	894±136	859±36	820±37	1257±207 <sup>abc</sup>
mg/100g BW	277±20	290±21	321±49	348±64 <sup>a</sup>
Adrenal weights,				
mg	26±4	28±2	27±6	26±10
mg/100g BW	8.0±0.8	9.3±0.6 <sup>a</sup>	10.4±1.0 <sup>a</sup>	7.1±2.9
Soleus muscle weights,				
mg	135±13	126±14	138±22	164±14 <sup>ab</sup>
mg/100g BW	42±2	42±3	53±2 <sup>ab</sup>	45±5
<i>female</i>				
Body weights				
at 8wk-age, g	189±11	219±6 <sup>a</sup>	179±17 <sup>b</sup>	192±21 <sup>b</sup>
at 10wk-age, g	219±19	233±14	221±34	266±22 <sup>ab</sup>
% increment	16±9	6±5 <sup>a</sup>	23±9	39±6 <sup>a</sup>
Heart weights,				
mg	725±106	668±37	717±144	837±65 <sup>b</sup>
mg/100g BW	329±25	287±8 <sup>a</sup>	323±17 <sup>b</sup>	316±31
Adrenal weights,				
mg	35±3	35±3	31±4	39±7
mg/100g BW	16.0±1.7	15.1±1.6	14.4±2.8	14.7±2.1
Soleus muscle weights,				
mg	97±10	109±9	100±12	112±17
mg/100g BW	44±2	46±1 <sup>a</sup>	46±7	42±5

Values are means ± SD. BW, body weight. <sup>a</sup>Significantly different (p<0.05) from SS group. <sup>b</sup>Significantly different (p<0.05) from SH group. <sup>c</sup>Significantly

different ( $p<0.05$ ) from HH group.

Table 1-2. Blood parameters

	SS	SH	HH	HS
<i>male</i>				
RBC, $\times 10^4/\mu\text{L}$	$902 \pm 32$	$996 \pm 26^a$	$874 \pm 54^b$	$773 \pm 80^{ab}$
Hb, g/dL	$16.9 \pm 0.4$	$18.7 \pm 1.5^a$	$18.2 \pm 0.7^a$	$15.7 \pm 1.3^{bc}$
Hct, %	$51.6 \pm 1.7$	$60.2 \pm 2.2^a$	$54.8 \pm 0.7^{ab}$	$52.0 \pm 8.9$
<i>female</i>				
RBC, $\times 10^4/\mu\text{L}$	$814 \pm 47$	$849 \pm 49$	$829 \pm 50$	$757 \pm 32^{ab}$
Hb, g/dL	$16.1 \pm 0.7$	$17.1 \pm 1.1$	$16.9 \pm 1.2$	$15.3 \pm 0.6^b$
Hct, %	$50.2 \pm 3.0$	$56.2 \pm 5.6^a$	$50.5 \pm 3.3$	$51.7 \pm 2.0$

Values are means  $\pm$  SD. RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit. <sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SS group. <sup>b</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SH group. <sup>c</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from HH group.

SS 群と比較して雄性では赤血球数が 10%、ヘモグロビン濃度が 11%、ヘマトクリット値が 17%増加し、雌性では赤血球数が 4%、ヘモグロビン濃度が 6%、ヘマトクリット値が 12%増加した。また、赤血球数およびヘモグロビン濃度は SS 群と比較すると雌雄ともに HH 群では増加、HS 群では減少の傾向がみられた。

### 3) 筋線維組成

ヒラメ筋の筋線維組成は SO 線維と FOG 線維で 96%以上が占められ、SO と FOG の中間タイプである INT 線維は 4%未満であった (Figure 1-1)。本実験では、SS 群、SH 群、HH 群、HS 群の順にしたがって SO 線維比率が減少し、雄性ではそれぞれ 89.3%、82.2%、75.7%、68.3%であり、雌性では 90.6%、85.9%、85.5%、77.9%であった。逆に FOG 線維比率は SS 群、SH 群、HH 群、HS 群の順に増加し、雄性ではそれぞれ 9.7%、16.4%、21.0%、29.4%であり、雌性

では 8.3%、11.5%、14.0%、20.4%であった (Table 1-3)。

Table 1-3. Fiber type distributions and SDH activities in single fibers in the soleus muscle

	SS	SH	HH	HS
<i>male</i>				
Distribution, %				
SO type	89.3 ± 3.4	82.2 ± 6.3 <sup>a</sup>	75.7 ± 9.3 <sup>a</sup>	68.3 ± 3.5 <sup>ab</sup>
INT type	1.1 ± 0.8	1.4 ± 1.6	3.3 ± 2.2	2.3 ± 2.1
FOG type	9.7 ± 3.5	16.4 ± 6.5	21.0 ± 8.7 <sup>a</sup>	29.4 ± 1.5 <sup>ab</sup>
SDH activity, O.D.				
SO type	0.23 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.02
FOG type	0.48 ± 0.09	0.43 ± 0.07	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.04
<i>female</i>				
Distribution, %				
SO type	90.6 ± 3.0	85.9 ± 3.9 <sup>a</sup>	85.5 ± 7.2	77.9 ± 7.1 <sup>a</sup>
INT type	1.0 ± 0.6	2.6 ± 2.2	0.5 ± 0.5	1.7 ± 1.0
FOG type	8.3 ± 2.8	11.5 ± 4.3	14.0 ± 7.2	20.4 ± 7.0 <sup>ab</sup>
SDH activity, O.D.				
SO type	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03
FOG type	0.47 ± 0.05	0.40 ± 0.06	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.04

Values are means ± SD. SDH activities are given in relative values of optical densities by SDH stain reaction. SDH, succinate dehydrogenase; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; INT, intermediate between SO and FOG. <sup>a</sup>Significantly different (p<0.05) from SS group. <sup>b</sup>Significantly different (p<0.05) from SH group.

#### 4) 単一筋線維のコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性

筋線維 1 本当たりの平均 SDH 活性 (O.D.)について、雄性では SO 線維の平均値が 0.23~0.26、FOG 線維が 0.43~0.48 の範囲にあり、また雌性においては SO



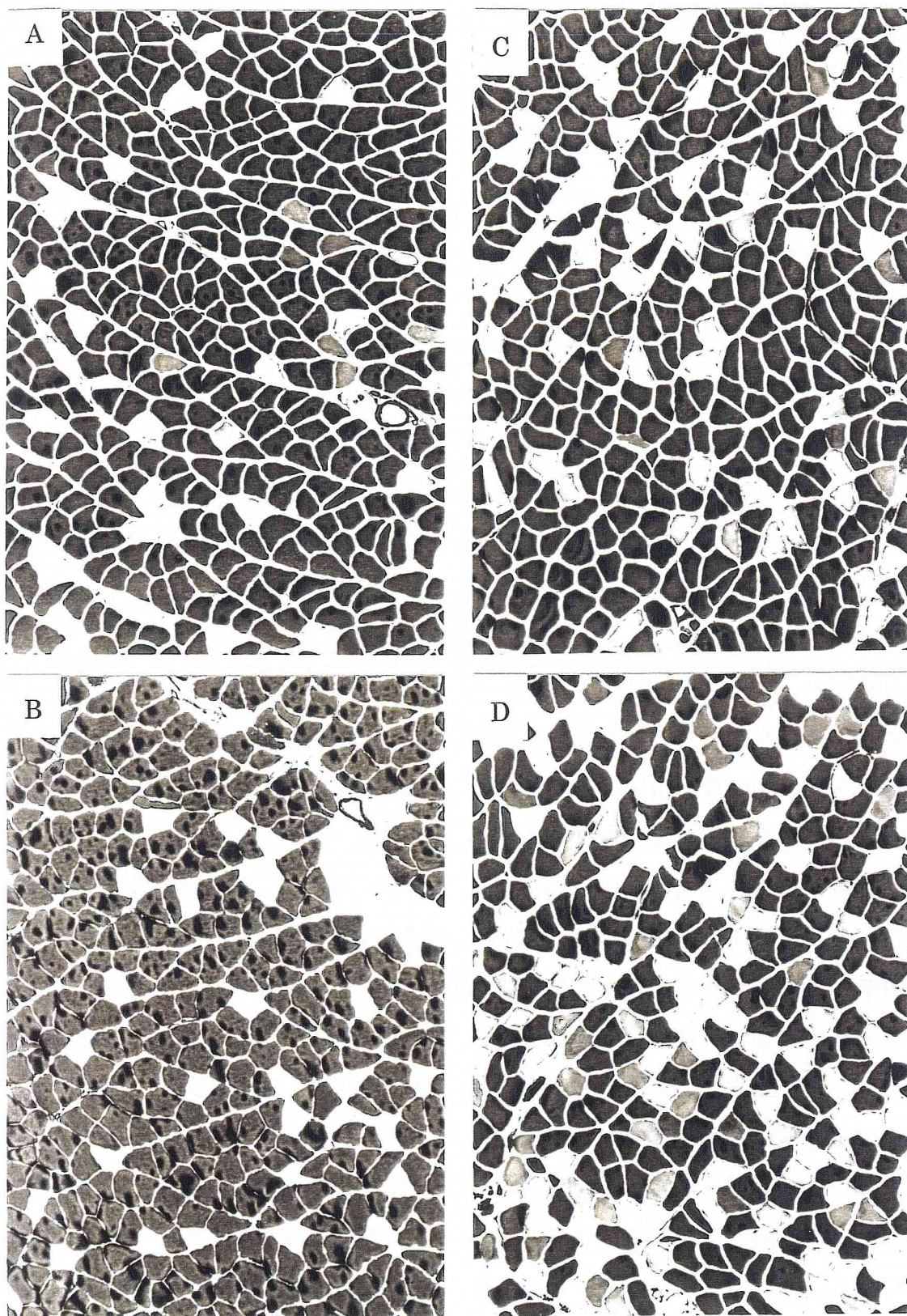


Figure 1-1. Cross sections of the soleus muscles stained for ATPase preincubated at pH 4.3 taken from SS (A), SH (B), HH (C), and HS (D) male rats. SO fibers stain darkly and FOG fibers lightly. Scale bar = 100  $\mu$  m.

線維が 0.28~0.29、FOG 線維が 0.40~0.47 の範囲にあって、雌雄ともに群間に有意差はなかった (Table 1-3)。

### 1. 3 考察

本実験では、低圧環境に対する生体の順応段階を示す急性適応期と慢性適応期を想定して、それぞれ SH 群および HH 群を設けた。低酸素状態に対する生体の適応性変化が経時的によく知られているもののひとつに、赤血球に関わる指標がある。赤血球の酸素運搬能は気圧環境の変化に対して迅速に対応し、赤血球数やその容積、ヘモグロビン濃度を変化させる。酸素分圧の減少した高所に滞在すると、赤血球に含まれるヘモグロビン濃度は高所に到着してから 2 時間後には増加が始まり、約 2 週間は亢進を続け、その後漸減しつつ安定化に向かう [竹本, 1980]。本実験で示された赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の各酸素運搬能の指標は、雌雄ともに SH 群で最高値を示し、HH 群の値は SS 群と SH 群の間に位置しており、高所順応における経時的変化の典型的なパターンを示した (Table 1-2)。したがって、SH 群で低圧環境への急性適応期を、HH 群で慢性適応期を想定した本実験の企図は、血液性状の比較からみた限り達成したものと判断される。なお HS 群の血液性状の各指標は、SS 群と同レベルかもしくは低値であった。HS 群は常圧環境へ移行する以前までに、慢性的な低圧環境曝露によって灌流毛細血管数の増加など末梢組織のレベルにおける低酸素適応が進行していたと考えられる [酒井と小林, 1987; 浅野, 1991]。これにより、低圧環境から常圧環境への移行に際しては、酸素分圧が上昇して赤血球の酸素飽和度が増加した分、赤血球数やヘモグロビン濃度を抑制することで末梢組織での酸素需給量のバランスが調節された結果、血液性状の各指標が SS 群と同等もしくはそれ以下のレベルにまで低下したものと推測される。HS 群の血液性状の変化から、低圧から常圧環境へ移行する場合においても、赤血球の酸素運搬能は酸素分圧の変化に迅速に対応して変化することが示された。

低圧環境への急性曝露期にあたる SH 群では、2 週間の体重増加率が 6~7% と有意に低下した (Table 1-1)。低圧環境への急性適応期では、吸気の酸素分圧の



減少を代償するために換気量や心拍出量が増加して、生命維持に必要とされる基礎代謝量が増加する〔黒島, 1993〕。このため、常圧下での生活よりも代謝量が増加してエネルギー消費が増大に傾くことが、体重増加の抑制される原因のひとつと考えられる。また低酸素曝露下では、摂食量の減少や消化不良から体重の減少が認められることも報告されている〔Boyer and Blume, 1988; Tanaka et al., 1997〕。他方、低圧環境から常圧環境へ移行した HS 群で体重増加率が 39~40% と最大を示した (Table 1-1) のは、低圧ストレスからの解放によってエネルギー消費が減少したことを反映していると考えられる。HH 群では体重増加率が雄性 37%、雌性 23%であり、SS 群の雄性 22%、雌性 16%を上回っているが (Table 1-1)、これは成長の進む時期が遅延して現れるためではないかと考えられる。成長・発育や組織の分化に関与する成長ホルモンや甲状腺ホルモンの産生器官 (下垂体、甲状腺) とその調節器官 (視床下部) は、低酸素ストレスの影響を受ける可能性が示唆されており〔ウォード・御手洗ら訳, 1976〕、成長期に現れるホルモン分泌の亢進時期が遅延すると考えられるが、詳細な機序は不明である。

酸素濃度の低い吸気が肺胞から血液に運搬される際には、肺動脈圧が上昇して血液の酸素飽和度を高めるように作用する。肺動脈圧の上昇が慢性的に続くと、肺循環を担う右心室壁の心筋や肺動脈血管の平滑筋に肥大の生ずることが知られている〔酒井と小林, 1987〕。本実験で、低圧環境への慢性的な低圧環境下にあった HH 群と HS 群の雄性では、心重量の相対値が SS 群と比較してそれぞれ 16%、26%の増加を示し (Table 1-1)、右心室筋の肥大化を反映していると考えられる。ただし雌性の HH 群と HS 群の心重量相対値には特に増加が認められなかった。HH 群の雌性と雄性を比較すると、ヘマトクリット値で 4 %以上雌性の方が低く、SS 群の雌性のヘマトクリット値と比較しても差がない (Table 1-2)。このことから、雄性に比較して雌性では低圧環境下にあっても血液粘度の上昇が少ないために血液の拍出にかかる心筋の負担が少なく、筋肥大が生じなかったことによるものと推測される。

体重 100 g 当たりのヒラメ筋重量は雄性の HH 群で 53 mg であり、SS 群と SH 群 (ともに 42 mg) に比べて高値を示したが、これは体重が低値であった結果と

考えられる (Table 1-1)。生後 10 週齢までの発育期に相当する期間にラットを低圧環境下で飼育すると、体重が減少して成長の抑制がみられることは Taguchi らにより報告されているが [Taguchi et al. 1985]、本実験においても慢性的な低酸素環境にあった雄性の HH 群の体重は他の 3 群よりも減少を示した。低酸素環境下では基礎代謝量が増加し、またエネルギー基質として遊離脂肪酸やグリセロールなどの脂質利用が増加することが知られており [Young et al., 1984]、体内での脂肪蓄積が抑制される。したがって、HH 群ではヒラメ筋重量の絶対値に減少はみられなかったが、体脂肪量の減少の影響によって、体重 100 g に対するヒラメ筋重量の相対値で示した場合は高値となったのではないかと考えられる。

高高所における生存率は雄性ラットに比べて雌性ラットの方が高く、低圧環境に対する耐性は雄性に比べて雌性の方が優れるとされ、その要因のひとつに性ホルモンの関与が報告されている [Moore et al, 1978; Ou and Smith, 1984; Ou et al., 1994]。本実験において、体重や各組織の重量、血液性状の各指標で雄性よりも雌性において群間の差が少なく、低圧環境の影響の現れが小さかったのは、低圧環境への適応に性差があることを反映していると考えられる。

ヒラメ筋の筋線維組成は、SS 群と比較すると雌雄ともに SH 群、HH 群、HS 群の順に SO 線維比率が低下し、逆に FOG 線維比率が増加した (Table 1-3)。この結果、低圧刺激が筋線維タイプを遅筋から速筋へと収縮特性を異にする筋線維タイプに移行させるとした Taguchi らの見解 [Taguchi et al., 1985] を再確認することができた。この筋線維のタイプ移行は、SH 群において雌雄ともに SO 線維比率が SS 群より有意 ( $p < 0.05$ ) に減少したことから、低圧環境曝露の初期の段階より SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行が始るものと考えられ、曝露期間が経過して慢性適応期に至って SO 線維と FOG 線維の組成比率が一定に収束していくものと推測される。

近年、宇宙環境に対する生体適応の科学が飛躍的に進歩したが、3~14 日間の宇宙飛行後、微小重力環境への曝露によって骨格筋の筋線維タイプが変化 (速筋線維へ移行) することが報告され、筋線維タイプの可塑性は極度の環境変化に対して短期間のうちに迅速な進行を示すものとみられる [Desplanches et al., 1990;

Holy and Mounier, 1991; Zhou et al., 1995; Caiozzo et al, 1996]。したがって、低圧環境曝露という環境変化に際しても、筋線維タイプに可塑性の生じる可能性が高いと考えられる。

本実験で興味を引くのは、4群の中でSO線維比率の最低値(FOG線維比率の最高値)を示したのが、雌雄ともにHS群であったことである(Table 1-3)。HS群の血液性状の各値は先述したようにSS群と同等以下のレベルにまで低下しており、HS群の血液・循環系は低圧から常圧への環境変化に迅速に順応していると考えられる。しかしながら筋線維組成に関していえば、SS群と同レベルにまでSO線維比率が上昇し、FOG線維比率が減少するという変化にあるのではなく、むしろSO線維比率が減少し、FOG線維比率が増加する傾向が大きくなっている。ここでは、血液性状にみられるような環境変化の方向に対する可逆性が、筋線維組成の変化からはみられない。

この問題を説明するのに十分な先行研究はないが、以下のような解釈が可能と思われる。ひとつには、筋線維のタイプ移行は血液性状の変化にみられるものと同様に、環境変化に対する可逆性を有しているが、環境の変化する方向によっては生体に与える影響に強弱があり、タイプ移行の進む速度や発現する時期に差がある。すなわち、常圧から低圧へと環境変化が進む場合には、ヒラメ筋組織の低酸素適応として筋線維組成のFOG線維化が2週間後には発現が観察されるのに対して、低圧から常圧へと環境変化が進む場合には、低酸素状態という生体へのストレスが緩和される方向にあり、環境ストレスに対する防衛反応として迅速なタイプ移行によって常圧環境のレベルに筋線維組成を復する必要がないため、FOG線維からSO線維へという可逆的な変化は緩やかに発現し、常圧環境への移行後2週間程度では筋線維組成の変化が顕在化しない。もうひとつの解釈として、常圧から低圧への環境変化を受けて、筋組織においてひとたび低酸素適応を果たした後は、酸素濃度の変化に対する感受性が亢進して、環境変化というストレスに防衛的に反応する傾向が生ずるのではないか。すなわち、低酸素刺激そのものだけではなく、常圧から低圧あるいは低圧から常圧といった酸素濃度の上昇・下降というゆらぎに対して筋組織が反応し、FOG線維比率の増加した組成を持続

するのかもしれない（これに関しては第3章において言及する）。

ラットの骨格筋を構成する筋線維は、ヒトの骨格筋に比較してミオグロビン量やミトコンドリア量が多く、全体に赤味が強い。タイプ分類上ではおなじ FOG 線維であっても、ヒトと比べてラットのものは酸化系酵素活性が高い。ラットの骨格筋にみられる筋線維タイプ別の酸化系代謝能の大きさは、一般的に  $SO \geq FOG \geq FG$  の順となるが、ヒラメ筋に関してはこのとおりではない。筋線維 1 本当たりの SDH 活性の平均値は SO 線維よりも FOG 線維が有意に高いことは Bell らによって報告されているが [Bell et al., 1992]、本実験でも同様な結果を得た (Table 1-3)。すなわちラットのヒラメ筋に関しては、FOG 線維は SO 線維に比べて解糖系酵素活性に優れるばかりでなく、酸化系酵素活性も高いことがわかる。

本実験では、SO 線維の平均 SDH 活性および FOG 線維の平均 SDH 活性ともに 4 群の間に差はなく、低酸素状態による単一筋線維の酸化系酵素活性に変化はみられなかった (Table 1-3)。しかしながら先述したとおり、低圧環境に曝露された SH 群や HH 群、HS 群の筋線維組成では SO 線維比率が減少し、SO 線維よりも酸化系・解糖系能力に優れる FOG 線維の増加の方向に比率を移したことは、ヒラメ筋全体を観察した場合には酸化系および解糖系酵素活性を高める方向へシフトしたとみなすことができる。

低酸素状態に対して、酸化系酵素の活性亢進は筋組織に供給される酸素を効率的に利用するためには有効である。さらに低酸素状態が進行して筋組織への十分な酸素供給量の確保が困難となる場合には、酸化経路によるエネルギー産生が不安定となって解糖経路によるエネルギー産生への依存度を増すと考えられる。したがって、低圧環境下でヒラメ筋に FOG 線維比率の増加が生じた原因をヒラメ筋におけるエネルギー代謝の利点から推測すると、筋細胞内で酸化によるエネルギー産生の制限要因となる低酸素環境への曝露に対して、酸化系および解糖系の双方の経路の代謝能に優れた FOG 線維比率を増加させることは、不足しがちな酸素を効率的に利用するとともに、酸素不足に際しては解糖経路によるエネルギー産生への依存を可能とするような予備能力を高めた防衛反応であると解するこ

とができる。ヒラメ筋は姿勢維持に働く典型的な遅筋であり、間断なく緊張に曝されていることは電気生理学的にもよく知られている [Buller and Lewis, 1965]。このようなヒラメ筋に特徴的な筋緊張を持続する上で、エネルギー産生経路を酸化系および解糖系の双方から確保することは合目的的な反応であると考えられる。

## 第 2 章

### 低圧環境曝露と持久性運動負荷に対する骨格筋線維の応答

第1章において、低圧環境曝露がラット骨格筋の筋線維組成に及ぼす影響を解析した結果、胎生期から低圧環境に曝露し、低酸素環境への慢性適応期にあったと考えられる群（HH および HS 群）のヒラメ筋筋線維に占める速筋（FOG）線維の比率は、常圧環境下での生育群（SS 群）と比較して、雌雄ともに有意に高いことが示された。また8週齢から2週間の低圧曝露（SH 群）によっても速筋線維の比率は増加し、急性適応期より筋線維のタイプ移行が始まっていることが確認された。これらの結果、Taguchi らが示唆したように低圧ストレスによってヒラメ筋の筋線維タイプが遅筋（SO）線維から速筋（FOG）線維へ移行すること [Taguchi et al., 1985] を裏付けることができた。

高度 2,200 m 相当の比較的穏和な低圧性低酸素状態という環境ストレスにより、筋線維が従来考えられていたよりも容易にその収縮特性を変えることが可能であれば、活動筋における酸素需要の増大によって生体に低酸素状態をもたらす持久性運動の実施によって筋線維タイプを変化させることが可能であるかどうかを確認することは、運動生理学的に興味のある問題である。

序章で概観したとおり、従来までのヒトやラットを用いた先行研究によると、常圧環境下での運動トレーニングでは筋線維タイプは変化しにくく、特に持久性運動の負荷が収縮特性を異にする遅筋・速筋間で筋線維タイプの移行を引き起こすことはないと考えられている。しかし、低圧環境下で持久性運動を負荷した場合に筋線維組成にどのような影響が及ぶかについては先行研究が少なく、現在のところ明らかではない [Bigard et al., 1991; Green et al., 1992] 。

このような問題意識の契機は、言うまでもなく高所トレーニングに関する研究報告にある。高所トレーニングの原理は、持久性運動の負荷という行動体力の向上を図る側面と高所環境下での滞在という防衛体力の向上を図る側面との両面か



ら、全身の酸素供給と酸素消費を効率化する複合効果によって身体パフォーマンスの改善を期待するものである〔朝比奈, 1972〕。全身持久性運動を持続させるためには、必要となるエネルギー供給を酸化系（有酸素的）代謝に依存せざるをえない。高所という低酸素環境下での居住や積極的な運動が、呼吸・循環系から末梢組織に至るまでの酸素供給を効率化し、酸化系代謝能を増進させることによって不足しがちな酸素を有効に利用し、持久性作業のパフォーマンス向上が可能となることは数多くの研究結果が示している〔山地, 1992；浅野, 1994〕。

本章では、生体の内部環境に低酸素状態をもたらすという類似した要因を有する低圧環境への曝露と持久性運動の負荷とを取り上げ、それぞれが単独または複合した条件下において筋線維に及ぼす影響を比較し、先行研究結果を再検討することを企図した。

## 2. 1 材料と方法

本実験は、第1章で報告した低圧曝露実験と平行して行われたものであり、前章で交配に使用した同腹ラットから生まれた仔ラットによって実験群を設定した。

実験に関わる材料と方法の多くは第1章の記述と重複するため、主要な点のみを記す。

### 1) 実験動物および飼育環境

Sprague-Dawley 系ラット（船橋農場製）の一对の雌雄から生まれた同腹ラットを気圧環境条件の別に分離して飼育し、性成熟後に交配して、各々の気圧環境下で生まれた仔ラット（雄性）を使用して実験群を設けた。低圧環境はアクリル製低圧チャンバーを用いて 771 hPa（高度 2,200 m 相当）に設定した。8 週齢時点で、低圧および常圧環境下で生育したラットを、運動負荷群と非運動群とから以下の 6 群に区分した。

SS-T 群：常圧環境下で生まれ、常圧飼育を継続した運動負荷群

SH-T 群：常圧環境下で生まれ、8 週齢まで常圧飼育を行い、8 週齢から 10 週齢までの 2 週間は低圧環境下での飼育に移行した運動負荷群

HH-T 群：低圧環境下で生まれ、低圧飼育を継続した運動負荷群

SS-C 群：常圧環境下で生まれ、常圧飼育を継続した非運動群

SH-C 群：常圧環境下で生まれ、8 週齢まで常圧飼育を行い、8 週齢から 10 週齢までの 2 週間は低圧環境下での飼育に移行した非運動群

HH-C 群：低圧環境下で生まれ、低圧飼育を継続した非運動群

各群は 6 匹であったが、HH-T 群と HH-C 群は各 3 匹についてデータ分析ができた。

持久性運動には外周囲 97 cm の回転運動器を用い (Figure 2-1)、走行速度が 10 m/min となるように強制運動を 1 日 90 分、連続 14 日間課した。この走行速度は Fregosi と Dempsey の報告にもとづき、常圧下におけるラットの最大酸素摂取量の約 30～35 % に相当する運動強度を想定したもので [Fregosi and Dempsey, 1984]、疲労困憊に至らずに持続可能な比較的軽度の運動強度に設定した。なお SH-T 群と HH-T 群については、運動実施時にも低圧環境を維持した。

## 2) 試料採取

10 週齢時点に、ペントバルビタール麻酔下でヒラメ筋、心臓、左副腎に加えて長指伸筋を摘出し、湿重量を測定した。筋は急速凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また腹大動脈より 4 cc 程度を採血した。

ラットの長指伸筋は出生時にはすべて type II C (INT) 線維で占められ、生後 4～5 日より分化が始まる。生後 20 日までに type II C 線維は消失し、type I (SO) 線維が 10% 以下、大部分は速筋線維である type II A (FOG) と type II B (FG) とで占められる [岡田ら, 1981]。したがって、長指伸筋は、遅筋線維が多くを占めるヒラメ筋とはその収縮特性や疲労耐性においても対照的であることが、従来より電気生理的な実験によって知られている [Close, 1964]。長指伸筋とヒラメ筋は、筋線維組成や収縮・代謝特性が好対照であること、脛骨をはさんで位置し、筋の形態や重量に大きな差がないことから、それぞれ代表的な速筋、遅筋として筋生理実験にしばしば取り上げられる試料であり、本実験もそれに倣った。

## 3) 血液学的分析

採取した血液から、赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測

定した〔光田ら, 1990〕。

#### 4) 血清生化学的分析

骨格筋からの逸脱酵素として知られる血清中のクレアチンキナーゼ (CK) 活性と乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。クレアチンキナーゼ活性は、日本臨床化学会 (JSCC) の勧告法であるクレアチンリン酸・ADP を基質とした逆反応-UV 法によって測定した〔林と玄番, 1986〕。乳酸脱水素酵素活性は、乳酸を基質としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の還元を UV 法によって測定する国際臨床化学会 (IFCC) の勧告法に従った〔北村, 1982〕。

クレアチンキナーゼは骨格筋、心筋および脳に多量に存在し、心筋梗塞などの特定の疾患の場合を除けば、血清中のクレアチンキナーゼ活性の増減のほとんどが骨格筋に含まれるアイソザイムに由来する。乳酸脱水素酵素はほとんどの細胞に存在するが、骨格筋にも多量に含まれる。血清中のこの両酵素の活性が双方ともに上昇する場合は、筋細胞の損傷や壊死によって酵素が筋形質から逸脱して血液中に浸潤したことを意味するため、運動後の筋損傷の程度を示す指標として利用される〔河辺, 1997a, 1997b〕。

#### 5) 組織化学的分析

凍結したヒラメ筋と長指伸筋の筋腹部位から厚さ 10  $\mu$  m の連続横断切片を作成し、ATPase 染色〔Brooke and Kaiser, 1970a〕ならびに SDH 染色〔Nachlas et al., 1957〕を施して筋線維組成と筋線維タイプ別の SDH 活性を求めた。

## 2. 2 結果

### 1) 体重および組織重量

Table 2-1 に各群の体重とその増加率、各組織の湿重量とそれの体重 100 g に対する相対値を示した。8 週齢から 10 週齢までの 2 週間における体重の増加率は、運動負荷した 3 群と運動負荷を課さなかった 3 群のそれぞれの同一生育環境間では、体重増加率が有意 ( $p < 0.05$ ) に低下したのは SH-T 群 (3%) と SH-C 群 (7%) であり、体重増加率が最も高かったのは HH-T 群 (25%) と HH-C 群 (37%) であった。同一生育環境条件下にある運動群と非運動群との体重増加率

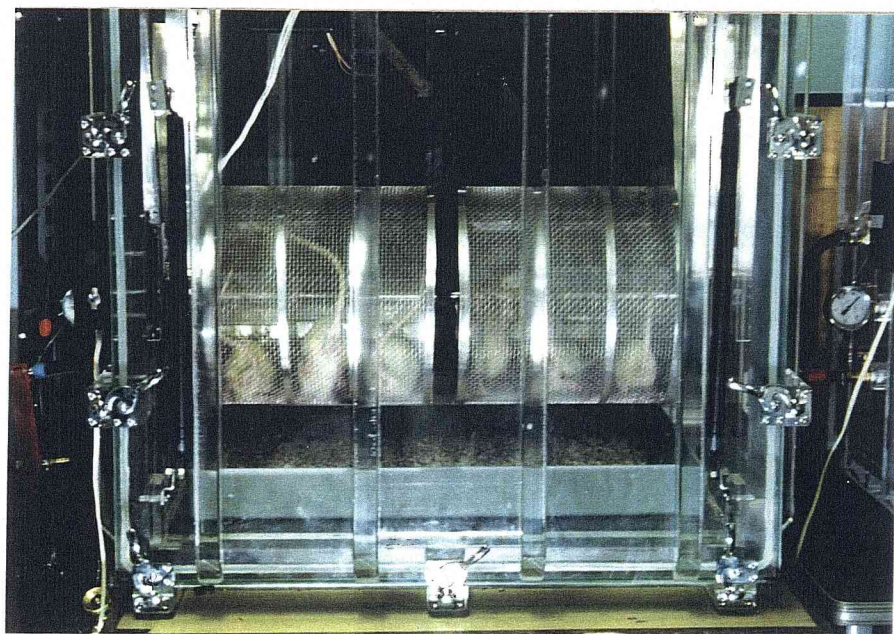
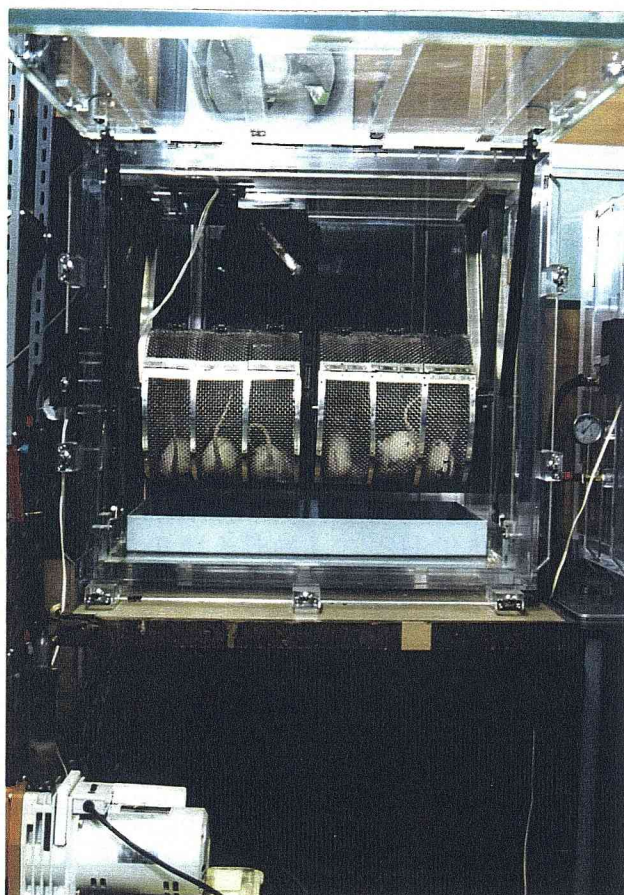


Figure 2-1. Normobaric (top) and hypobaric (bottom) trained rats in the hypobaric chamber with a motor-driven wheel.

の比較では、運動を負荷した群全てにおいて増加率の低下がみられた。

心臓、副腎、ヒラメ筋、長指伸筋の各組織重量の相対値は、運動群がそれぞれと同一環境下にある非運動群の値を全体的に上回った。特に副腎重量の平均値は体重 100 g に対して SS-T 群が 10.8 mg、SH-T 群が 13.0 mg であり、それぞれ SS-C 群の 8.0 mg、SH-C 群の 9.3 mg と比較して、それぞれ 35% および 40% の増加を示した。

## 2) 血液性状

Table 2-2 に、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値を示した。運動負荷した 3 群の中では、SS-T 群と比較して SH-T 群、HH-T 群で 3 指標全てが高値を示し、運動を負荷しなかった 3 群も同様に SS-C 群よりも SH-C 群、HH-C 群で高値を示した。SH-C 群と HH-C 群を比較すると、3 指標全てで SH-C 群

Table 2-1. Body weights, organ weights and muscle weights

<i>trained group</i>	SS-T	SH-T	HH-T
Body weights			
at 8wk-age, g	258 ± 25	278 ± 11	205 ± 26 <sup>ab</sup>
at 10wk-age, g	296 ± 17	288 ± 16	256 ± 18 <sup>ab</sup>
% increment	16 ± 11	3 ± 4 <sup>a</sup>	25 ± 8 <sup>b</sup>
Heart weights,			
mg	912 ± 92	857 ± 51	862 ± 66
mg/100g BW	308 ± 19	298 ± 7	339 ± 50
Adrenal weights,			
mg	32 ± 4*	37 ± 7*	30 ± 4
mg/100g BW	10.8 ± 1.2*	13.0 ± 2.8*	11.6 ± 1.0
Soleus muscle weights,			
mg	136 ± 11	129 ± 12	125 ± 17
mg/100g BW	46 ± 5	45 ± 4	49 ± 3
EDL muscle weights,			
mg	151 ± 18	143 ± 8	137 ± 18
mg/100g BW	51 ± 4*	50 ± 3	53 ± 3

<i>untrained group</i>	SS-C	SH-C	HH-C
Body weights			
at 8wk-age, g	264 ± 17	278 ± 11	190 ± 38 <sup>ab</sup>
at 10wk-age, g	321 ± 27	297 ± 16	259 ± 40 <sup>a</sup>
% increment	22 ± 9	7 ± 2 <sup>a</sup>	37 ± 10 <sup>b</sup>
Heart weights,			
mg	894 ± 136	859 ± 36	820 ± 37 <sup>a</sup>
mg/100g BW	277 ± 20	290 ± 21	321 ± 49 <sup>a</sup>
Adrenal weights,			
mg	26 ± 4	28 ± 2	27 ± 6
mg/100g BW	8.0 ± 0.8	9.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	10.4 ± 1.0 <sup>a</sup>
Soleus muscle weights,			
mg	135 ± 13	126 ± 14	138 ± 22
mg/100g BW	42 ± 2	42 ± 3	53 ± 2 <sup>ab</sup>
EDL muscle weights,			
mg	144 ± 11	149 ± 12	126 ± 26
mg/100g BW	45 ± 5	50 ± 3 <sup>a</sup>	48 ± 5

Values are means ± SD. BW, body weight; EDL, extensor digitorum longus.

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the untrained group. <sup>a</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from SS-T or SS-C group. <sup>b</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from SH-T or SH-C group.

の方が上回っているが、SH-T 群と HH-T 群とではヘモグロビン濃度のみ HH-T 群の平均値が 19.3 g/d l であり、SH-T 群の 17.4 g/d l を 11% 上回った。同一生育環境条件にある運動群と非運動群との間には有意な差は認められなかった。

### 3) 血清中のクレアチンキナーゼおよび乳酸脱水素酵素活性

血清中のクレアチンキナーゼ (CK) と乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を Table 2-3 に示した。SH-T 群と SH-C 群の LDH 活性に有意差 ( $p < 0.05$ ) がみられたのは、同一生育環境条件にある運動群と非運動群の間に差はなかった。運動負荷した 3 群の中では、SH-T 群の CK 活性の平均値が SS-T 群と比較して 39%、

HH-T 群と比較して 86%増加し、SH-T 群の LDH 活性の平均値が SS-T 群と比

Table 2-2. Blood parameters

<i>trained group</i>	SS-T	SH-T	HH-T
RBC, $\times 10^4/\mu\ell$	883 $\pm$ 37	935 $\pm$ 58	919 $\pm$ 12
Hb, g/d $\ell$	16.5 $\pm$ 0.5	17.4 $\pm$ 1.4	19.3 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
Hct, %	50.8 $\pm$ 2.5	59.9 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	57.1 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
<i>untrained group</i>	SS-C	SH-C	HH-C
RBC, $\times 10^4/\mu\ell$	902 $\pm$ 32	996 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	874 $\pm$ 54 <sup>b</sup>
Hb, g/d $\ell$	16.9 $\pm$ 0.4	18.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	18.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
Hct, %	51.6 $\pm$ 1.7	60.2 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	54.8 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>

Values are means  $\pm$  SD. RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit. <sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SS-T or SS-C group.

<sup>b</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SH-T or SH-C group.

No significant differences between trained and untrained groups.

Table 2-3. Serum CK and LDH activities

<i>trained group</i>	SS-T	SH-T	HH-T
CK, IU/ $\ell$	1154 $\pm$ 476	1602 $\pm$ 989	862 $\pm$ 608
LDH, IU/ $\ell$	1146 $\pm$ 410	1498 $\pm$ 438*	729 $\pm$ 52 <sup>b</sup>
<i>untrained group</i>	SS-C	SH-C	HH-C
CK, IU/ $\ell$	866 $\pm$ 363	1600 $\pm$ 555 <sup>a</sup>	929 $\pm$ 246
LDH, IU/ $\ell$	1172 $\pm$ 404	2250 $\pm$ 559 <sup>a</sup>	1133 $\pm$ 270 <sup>b</sup>

Values are means  $\pm$  SD. CK, creatine kinase; LDH, lactate dehydrogenase. \*Significantly different ( $p<0.05$ ) from SH-C group.

<sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SS-C group. <sup>b</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SH-T or SH-C group.



較して 31%、HH-T 群と比較して 105%増加した。運動負荷をしなかった 3 群の中では運動負荷した 3 群と同様に SH-C 群で CK 活性、LDH 活性ともに高く、SH-C 群の CK 活性の平均値は SS-C 群と比較して 85%、HH-C 群と比較して 72%増加し、SH-C 群の LDH 活性の平均値は SS-C 群と比較して 92%、HH-C 群と比較して 96%の増加を示した。SS-C 群と HH-C 群の CK 活性および LDH 活性は同レベルにあった。

Table 2-4. Fiber type distributions and SDH activities in single fibers in the soleus muscle

<i>trained group</i>	SS-T	SH-T	HH-T
Distribution, %			
SO type	87.1 ± 3.4	88.7 ± 6.5	73.0 ± 7.0 <sup>a</sup>
INT type	2.1 ± 1.4	1.3 ± 1.3	2.8 ± 2.3
FOG type	10.8 ± 3.0	10.0 ± 5.3	24.2 ± 4.8 <sup>a</sup>
SDH activity, O.D.			
SO type	0.10 ± 0.02*	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.05
FOG type	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.27 ± 0.04 <sup>a</sup>
<i>untrained group</i>	SS-C	SH-C	HH-C
Distribution, %			
SO type	89.3 ± 3.4	82.2 ± 6.3 <sup>a</sup>	75.7 ± 9.3 <sup>a</sup>
INT type	1.1 ± 0.8	1.4 ± 1.6	3.3 ± 2.2
FOG type	9.7 ± 3.5	16.4 ± 6.5	21.0 ± 8.7 <sup>a</sup>
SDH activity, O.D.			
SO type	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.01
FOG type	0.24 ± 0.08	0.24 ± 0.04	0.20 ± 0.06

Values are means ± SD. SDH activities are given in relative values of optical densities. SDH, succinate dehydrogenase; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; INT, intermediate between SO and FOG. \*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from SS-C group. <sup>a</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from SS-T or SS-C group.



Table 2-5. Fiber type distributions and SDH activities in single fibers in the EDL muscle

<i>trained group</i>	SS-T	SH-T	HH-T
Distribution, %			
SO type	5.5 ± 2.0	5.5 ± 2.5	6.7 ± 0.6
FOG type	47.4 ± 4.2	49.8 ± 5.7	43.3 ± 7.6
FG type	47.1 ± 4.3	44.8 ± 5.8	50.0 ± 7.6
SDH activity, O.D.			
SO type	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.05
FOG type	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.05
FG type	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.02
<i>untrained group</i>	SS-C	SH-C	HH-C
Distribution, %			
SO type	7.3 ± 2.3	5.3 ± 0.6	5.8 ± 0.8
FOG type	43.5 ± 9.6	47.4 ± 5.4	46.3 ± 6.0
FG type	49.3 ± 9.1	47.3 ± 5.3	47.8 ± 5.5
SDH activity, O.D.			
SO type	0.18 ± 0.03	0.24 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.03
FOG type	0.17 ± 0.04	0.22 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.02
FG type	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.02

Values are means ± SD. SDH activities are given in relative values of optical densities. SDH, succinate dehydrogenase; EDL, extensor digitorum longus; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; FG, fast-twitch glycolytic. <sup>a</sup>Significantly different (p<0.05) from SS-T or SS-C group. No significant differences between trained and untrained groups.

#### 4) ヒラメ筋および長指伸筋の筋線維組成

ヒラメ筋の筋線維組成 (Table 2-4, Figure 2-2) は、運動負荷した3群の中ではHH-T群のSO線維比率の平均値が73.0%、FOG線維比率が24.2%であり、

SS-T 群の SO 線維比率 87.1%、FOG 線維比率 10.8%と比較して有意差 ( $p<0.05$ ) が認められた。ただし SH-T 群の SO 線維比率は 88.7%、FOG 線維比率は 10.0% であり、SS-T 群との間に差はなかった。運動を負荷しなかった 3 群間では、SS-C 群と比較して SH-C 群および HH-C 群において SO 線維比率の減少と FOG 線維比率の増加が確認された。また、同一生育環境条件にある運動群と非運動群の間に差はなかった。

長指伸筋の筋線維組成 (Table 2-5, Figure 2-3) は FOG 線維と FG 線維とで約 94% の組成比率が占められる。長指伸筋の筋線維組成に生育環境条件の違いや運動負荷の有無による影響は認められなかった。

#### 5) ヒラメ筋および長指伸筋における単一筋線維の SDH 活性

ヒラメ筋では、運動負荷した 3 群の中で HH-T 群の FOG 線維の SDH 活性が SS-T 群や SH-T 群よりも 35~42% 高かった。同一生育環境条件にある運動群と非運動群の間に差がみられたのは SS-T 群と SS-C 群の SO 線維の平均 SDH 活性のみであり、運動負荷による特定の影響は認められなかった (Table 2-4)。

長指伸筋では、運動を負荷しなかった 3 群の中で SS-C 群に比較して SH-C 群で SDH 活性の増加がみられ、SO 線維で 33%、FOG 線維で 39%、FG 線維で 100% 上回った。同一生育環境条件の運動群と非運動群との間に差はなかった (Table 2-5)。

## 2. 3 考察

8 週齢から 10 週齢までの 2 週間の体重増加率は、運動負荷した 3 群では SS-T 群、SH-T 群および HH-T 群の順にそれぞれ 16%、3%、25% であり、運動負荷を加えなかった 3 群では SS-C 群、SH-C 群および HH-C 群の順にそれぞれ 22%、7%、37% であり、常圧から低圧へ移行した環境条件の下で最も増加率が低く、低圧状態が継続した環境条件の下で最も増加率が高いという類似した傾向を示した (Table 2-1)。このことは第 1 章でも記したように、発育段階における体重増加率の変化パターン (いわゆる成長曲線) に低酸素ストレスが影響を及ぼすためと考えられ、持久性運動の負荷は消費エネルギーの増大分に見合う程度に

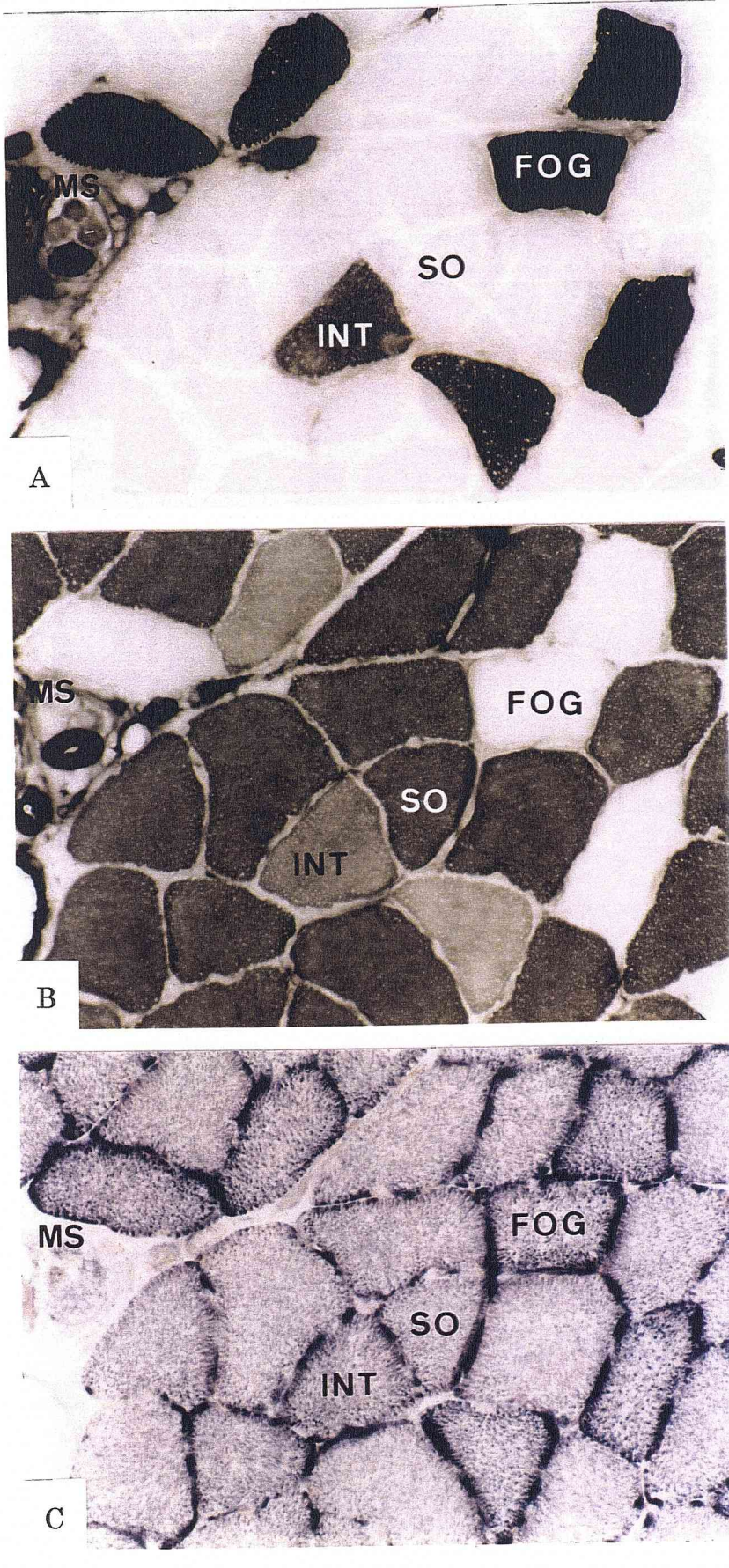


Figure 2-2. Serial cross sections of the soleus muscle taken from a SS-C rat stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), at pH 4.3 (B), and succinate dehydrogenase (C). MS, muscle spindle; SO, slow-twitch oxidative fiber; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic fiber; INT, intermediate fiber between SO and FOG. Scale bar = 50  $\mu$  m.



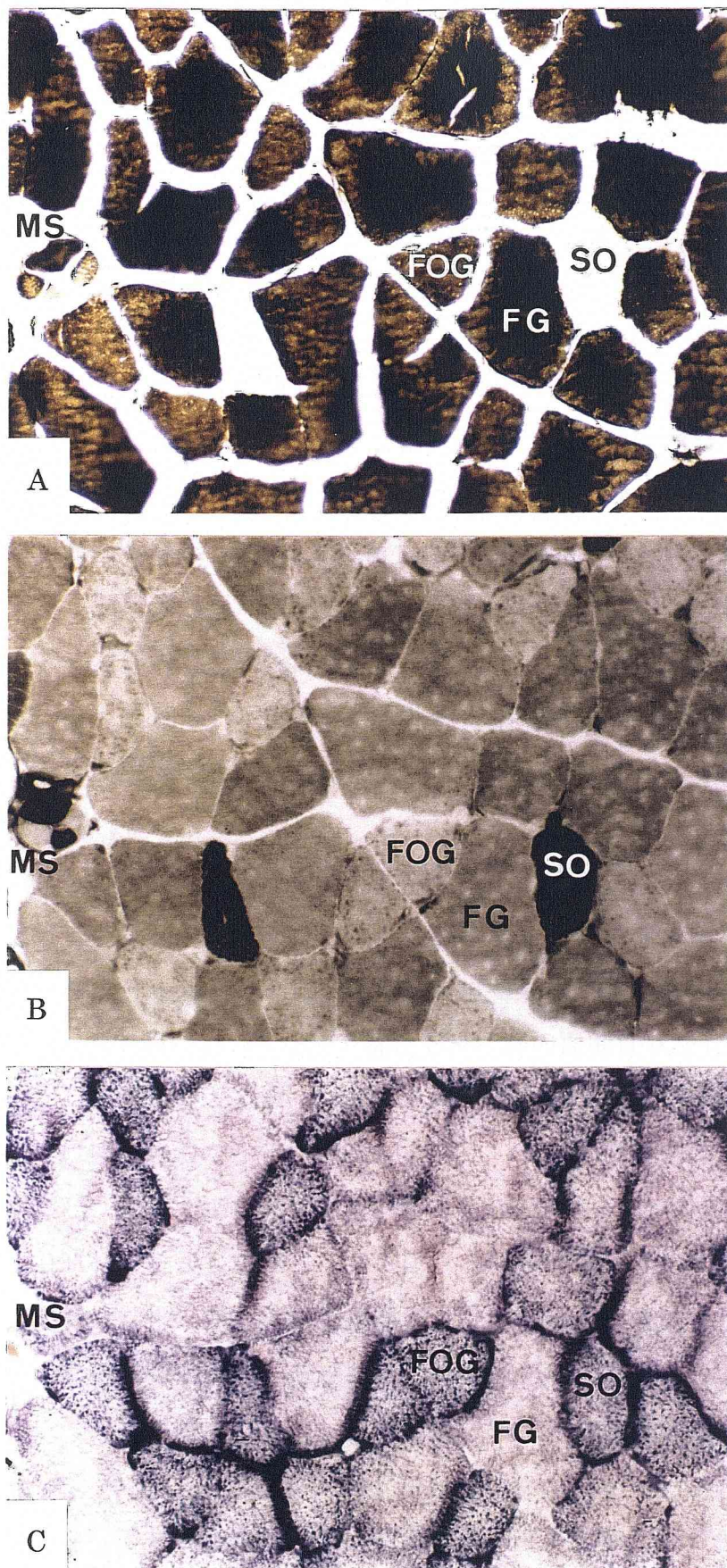


Figure 2-3. Serial cross sections of the extensor digitorum longus muscle taken from a SS-C rat stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), at pH 4.5 (B), and succinate dehydrogenase (C). MS, muscle spindle; SO, slow-twitch oxidative fiber; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic fiber; FG, fast-twitch glycolytic fiber. Scale bar = 50  $\mu$  m.

体重増加を抑制する効果にとどまるものと推測される。運動負荷した3群では、体重増加が抑制された結果、各器官・組織の体重100gに対する重量の相対値は非運動群に比較して総じて増加した(Table 2-1)。特に副腎重量はSS-T群、SH-T群がそれぞれSS-C群、SH-C群よりも絶対値において23%および32%、相対値において35%および40%と有意( $p<0.05$ )に増加したが、これは交感神経・副腎髄質系および視床下部・下垂体・副腎皮質系の活動が亢進するストレス応答を反映していると考えられる[前多, 1997]。低圧環境下でみられる低酸素血症によって副腎皮質・髄質機能が亢進すること[渡部と武部, 1992]、また運動時には交感神経系の亢進によって副腎髄質からカテコールアミンの分泌が促進されること[鈴木, 1992]は知られており、SH-T群の副腎重量が特に肥大化を示したのは、急性的な低圧環境曝露と持久性運動の負荷というストレスが複合的に影響したためと推測される。

常圧環境下で持久性トレーニングを施した場合、血液性状にほとんど変化はみられないが、十分にトレーニングを行っている長距離走者では血漿量が増加(ヘマトクリット値が減少)しており、血液粘性を下げる効果が示唆されている[襦屋と川原, 1997]。本実験においてSS-T群とSS-C群の血液性状を比較すると、赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値のいずれも差はなく、持久性運動負荷の影響は観察されなかった(Table 2-2)。一方、低酸素環境下では赤血球数やヘモグロビン濃度が増加し、赤血球から末梢組織への酸素運搬能が増強される[浅野, 1991]。しかしながら、このような血液性状の変化にはヘマトクリット値の上昇が伴う結果、血液の粘性が高まり、血液の単位時間あたりの循環量が減少したり、心拍出時の負荷や末梢血管での抵抗が増大するため、運動時には必ずしも有利に働くとは限らない。したがって、効果的な酸素摂取には至適なヘマトクリット値のあることが示唆されている[Crowell et al, 1959; 酒井, 1977]。本実験においてHH-T群ではSH-T群と比較すると赤血球数やヘマトクリット値は低かったが、ヘモグロビン濃度は11%上回った(Table 2-2)。低酸素環境下で持久性運動を実施した場合には、血液粘性の増加を抑制しつつ、酸素運搬能を増進させることが望ましい。その意味では、HH-T群にみられたヘマト

クリット値の上昇の抑制とヘモグロビン濃度の増加という血液性状の変化は合理的であり、これは高所トレーニング時に特徴的な一個の赤血球内のヘモグロビン濃度が高まる高色素性適応〔浅野, 1991〕の効果であると考えられる。

血清中のクレアチンキナーゼ (CK)と乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性 (Table 2-3) は、SS-T 群と SS-C 群および HH-T 群と HH-C 群のレベルに差異がないことから、本実験で課した運動強度では筋損傷を引き起こさず、当初企図したとおりに比較的軽度な運動であったことを示す。したがって、SH-T 群と SH-C 群がともに CK と LDH の双方の活性の上昇を示したのは、運動負荷の有無に無関係である以上、低圧環境への急性曝露という環境要因に対する生体反応の結果、骨格筋細胞に損傷あるいは壊死が生じた可能性がある。第 1 章に記したように、急性低酸素曝露下では基礎代謝を司る甲状腺ホルモンの分泌が亢進して代謝量を増加させる。甲状腺ホルモンにはタンパク質異化作用のあることが知られており〔佐久間, 1999〕、SH-T 群と SH-C 群にみられた CK 活性と LDH 活性の上昇は、筋タンパク質の分解が活発である状態を反映しているのかもしれない。また一方で代謝機能からみると、低圧環境への急性適応期にある SH-T 群と SH-C 群では、低酸素状態に対して末梢組織で毛細血管の灌流促進やミトコンドリア密度の増加などによる酸化系代謝経路の順応が整うまでの間は、エネルギー産生において無酸素的代謝であるクレアチンリン酸系や解糖系代謝経路への依存度が高まることが推測される。このため、一時的に CK 活性と LDH 活性の亢進がみられたとも考えられる。

ヒラメ筋の筋線維組成 (Table 2-4) は、SS-T 群で SO 線維比率 87.1%、FOG 線維比率 10.8%であり、SS-C 群で SO 線維比率 89.3%、FOG 線維比率 9.7%であり、両群の間に差はなかった。したがって、従来の先行研究〔Gollnick et al., 1973; Costill et al., 1979〕に同じく、常圧環境下での運動負荷による筋線維組成の変化は観察されなかった。また、HH-T 群では SO 線維比率 73.0%、FOG 線維比率 24.2%であり、SS-T 群に比較して有意 ( $p<0.05$ ) に SO 線維比率が減少し、FOG 線維比率が増加した。ただし、HH-T 群と HH-C 群 (SO 線維比率 75.7%、FOG 線維比率 21.0%) との間に差はなく、低圧環境下で引き起こされるヒラメ



筋の筋線維タイプ移行が持久性運動を負荷することによって促進または抑制されるといった影響は観察されなかった。これらの結果から、低圧環境と持久性運動とは生体に低酸素状態をもたらすという点において類似した作用を有するが、それぞれの刺激に対して筋線維組成が示した反応に相互作用はみられなかった。したがって、低圧環境に曝露された場合には筋線維のタイプ移行が発現し、持久性運動を負荷された場合には筋線維のタイプ移行を必要としないというように、生体内に引き起こされた低酸素状態に対する筋組織の適応は、双方の場合では異った機序が働いているものと考えられる。

SH-C 群では SO 線維比率 82.2%、FOG 線維比率 16.4%であり、SS-C 群と比較して SO 線維の減少と FOG 線維の増加が認められたが、SH-T 群では SO 線維比率 88.7%、FOG 線維比率 10.0%であり、SS-T 群と差がなかった。SH-T 群に筋線維組成の変化が現れなかった原因として、SS-T 群の副腎に肥大化がみられたことから (Table 2-1)、急性的に低圧環境への曝露と運動負荷とが加えられたため、生体にとって過度なストレスとなって、低圧環境に対する適応の進行が抑制されたのではないかと推測される。生体がストレスに曝された際に分泌が増加する副腎皮質ホルモンのひとつであるグルココルチコイドには、タンパク質の異化作用のほか、ヒラメ筋のミオシン重鎖アイソフォームを type II A から type I に移行させる作用のあることが報告されている [Polla et al., 1994]。したがって、グルココルチコイドのように、低圧環境下で引き起こされる遅筋タイプから速筋タイプへの移行の方向とは相反する作用を有する因子がストレス反応時に現れたことが考えられる。

Bigard らはラットに高度 4,000 m 相当の低圧環境で水泳トレーニングを実施した実験においてヒラメ筋の筋線維組成に変化を認めていない [Bigard et al., 1991]。高度 4,000 m 相当の低圧度は、持久性運動の実施においては相当に過酷な環境条件であると考えられる [山地, 1992; 浅野, 1994]。したがってラットにみられるヒラメ筋の筋線維タイプ移行は、中程度の低圧環境条件下で発現する適応現象であることも考えられ、低圧度と筋線維組成の変化の関係を検討する必要がある (これに関しては第 5 章において言及する)。

一方、長指伸筋の筋線維組成には、生育環境条件の違いや運動負荷の有無による影響は全くみられなかった (Table 2-5)。従来報告された長指伸筋にみられる筋線維タイプの変化は全て速筋線維のサブタイプ間であり、Taguchi らが5週間の低圧トレーニング後に FOG 線維比率の増加と FG 線維比率の減少を報告しているほかに、Bigard らも14週間の低圧トレーニング後に type II A の増加と type II B の減少を報告している [Taguchi et al., 1985; Bigard et al., 1991]。本実験では長指伸筋の筋線維組成に変化は生じなかったが、この原因としてはトレーニング期間が2週間と短期間であったこと、および運動強度が軽度であったことによる差異ではないかと考えられる。

ヒラメ筋の単一筋線維における平均 SDH 活性は、総じて環境条件や運動負荷による特定の傾向は認められなかった (Table 2-4)。第1章において考察したとおり、ヒラメ筋の SDH 活性は、SO 線維 (0.10~0.13, O.D.) に比較して FOG 線維 (0.19~0.27, O.D.) で高く、低圧環境下での SO 線維から FOG 線維への移行には酸化系代謝能を高めるという点で生体に有利に働くものと考えられる。

一方、長指伸筋では単一筋線維の SDH 活性に運動負荷が及ぼす影響はみられなかった (Table 2-5)。ただし、SS-T 群や SS-C 群に比べると、低圧環境に曝露した SH-T 群、SH-C 群、HH-T 群、HH-C 群の FOG 線維と FG 線維の SDH 活性に増加する傾向がみられた。長指伸筋の SO 線維と FOG 線維の SDH 活性レベルは、ヒラメ筋の場合とは異なり、FOG 線維 (0.17~0.22, O.D.) に比べて SO 線維 (0.18~0.24, O.D.) の方がやや活性が高いか、ほとんど同じレベルにある。したがって、長指伸筋に SO 線維と FOG 線維の間にタイプ移行が生じないのは、組成比率の6%程度にとどまる SO 線維が FOG 線維にタイプ移行することが、筋組織において酸化系代謝能の増進にはさほど有利とならないためではないかと考えられる。Taguchi らや Bigard らの研究結果 [Taguchi et al., 1985; Bigard et al., 1991] に現れたように、長指伸筋の組成比率の大部分を二分している FOG 線維と FG 線維との間においてタイプ移行が生じた場合には、酸化系代謝能の増進には有利である。本実験では、低圧環境によって長指伸筋の筋線維組成に変化はみられなかったが、FOG 線維と FG 線維の SDH 活性に若干の上昇がみられたこと



は、ほとんどが速筋線維で構成される長指伸筋の筋線維組成においては適合した代謝系の変化であったといえる。

ヒラメ筋と長指伸筋という対照的な特性を有する骨格筋を用いた本実験の結果から、低圧環境下で現れる筋線維タイプの移行あるいは無移行は、筋に固有の収縮特性や代謝特性を反映したその筋に特異的な反応であり、あらゆる筋において一様な方向でタイプ移行が生じるといった広汎的な性質のものではないことが窺える。

### 第 3 章

#### 変動低酸素環境と持久性運動負荷に対するヒラメ筋の応答

第 1 章において高度 2,200 m 相当の低圧性低酸素環境の下ではラットのヒラメ筋において筋線維タイプが遅筋 (SO) 線維から速筋 (FOG) 線維へと組成比率をシフトすること、また第 2 章において長時間の高代謝性運動はみかけ上の代謝平衡 (apparent metabolic steady state) を保っても、筋細胞の低酸素状態をもたらすことによって筋線維組成を変化させるには至らないことが明かとなった。

第 1 章に記した実験においてヒラメ筋の筋線維組成に占める FOG 線維の比率が最大となったのは、低圧環境下に生育してその後 2 週間を常圧環境に移行させた HS 群であった。血液が気圧環境の変化に順応して迅速にその性状 (赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値) を変化させ、常圧から低圧環境へ移行した場合または低圧から常圧環境へ移行した場合には可逆的に反応するのに対して、筋組織では常圧から低圧環境へ移行した場合にみられた SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行が、低圧から常圧環境への移行に際しては可逆性 (FOG 線維から SO 線維へのタイプ移行) を示さず、むしろ低圧下で進行するヒラメ筋筋線維の速筋化を維持することを確認した。

高所登山の現場では、迅速に高所順応を果たし、かつ疲労の蓄積を防止するために、高度を一旦上げてからキャンプに引き返して休息する、といった高度の上昇と下降の手順を数度繰り返す、その繰り返し高度を漸増しながらアタックする方法 (アルパイン・スタイル) が主流となっている [島岡, 1991]。また高所トレーニングにおいても、高所でのトレーニングと平地でのトレーニングを繰り返すインターバル・トレーニングやその改良法 (例: 高所に滞在してトレーニングは平地に移動しておこなう) が試みられており、低酸素環境への順応速度や持久性パフォーマンスの改善には、高所に長期間滞在してトレーニングを続けるよりも有力であるとの見方がある [山地, 1992; Levine and Stray-Gundersen, 1997]。

高所登山や高所トレーニングに関する報告と第1章での実験結果から、一定の低酸素環境下よりも、酸素濃度に高低を与えて変化させた環境下の方が低酸素状態への適応が円滑に進行し、筋線維組成の変化にも反映するのではないかという予測にもとづき、本章では間欠的な低酸素環境曝露に対するヒラメ筋の応答の解析を試みた。あわせて持久性運動負荷の影響についても検討した。

### 3. 1 材料と方法

#### 1) 実験動物および飼育環境

7週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット（船橋農場製）30匹から、環境条件の別と持久性運動負荷の有無によって6つの実験群（各群  $n = 5$ ）を設けた。

飼育環境条件は空気中の酸素濃度によって3つに区分し、以下の略号で示した。なお酸素濃度は窒素と酸素との混合ガスの割合を変えることによって調節した。

SL: この環境条件は常圧 (1,013 hPa) における自然状態 (酸素分圧 212 hPa, 酸素濃度 20.93%, 高度 0 m 相当) を示す

FH: この環境条件は吸気中の酸素分圧が常圧において 162 hPa (常圧下での酸素濃度にして 16.0%、高度 2,200 m における大気圧酸素分圧に相当) の混合ガスを1日45分間吸気させた間欠的固定低酸素状態を示す

CH: この環境条件は吸気中の酸素分圧が常圧において、i) 188 hPa (常圧下での酸素濃度にして 18.6%、高度 1,000 m における大気圧酸素分圧に相当)、ii) 162 hPa (常圧下での酸素濃度にして 16.0%、高度 2,200 m における大気圧酸素分圧に相当) およびiii) 147 hPa (常圧下での酸素濃度にして 14.5%、高度 3,000 m における大気圧酸素分圧に相当) という3種類の混合ガスを、i → ii → iii → ii → i → ii → …の順に2日毎の周期で Figure 3-1 に示すように規則的に変えて、1日45分間吸気させた間欠的変動低酸素状態を示す

これらの生育環境条件の下で、7週齢から24日間（10週齢まで）に亘って飼育した。また、各環境条件下にあるラットを二分して、持久性運動を負荷したものをそれぞれ SL-T 群、FH-T 群および CH-T 群、運動を負荷しなかったものを

それぞれ SL-C 群、FH-C 群および CH-C 群とした。運動は間欠的低酸素曝露下の 45 分間に実施し（低酸素トレーニング）、第 2 章に記した実験と同じ回転運動器（Figure 2-1）を用いて、15.3 m/min の走速度による強制運動を 24 日間連続して課した。

今回の実験では、第 1 章や第 2 章における実験のような気圧の減少によって低酸素状態を創出するのではなく、酸素濃度を減少させた窒素・酸素混合ガスによって常圧下低酸素状態を創出して実験環境とした。混合ガスによる低酸素環境の創出を選択したのは、短時間の低酸素環境の制御には、混合ガスを使用する方が酸素濃度の管理を厳密かつ迅速に実施できるという利点を重視したことによる。

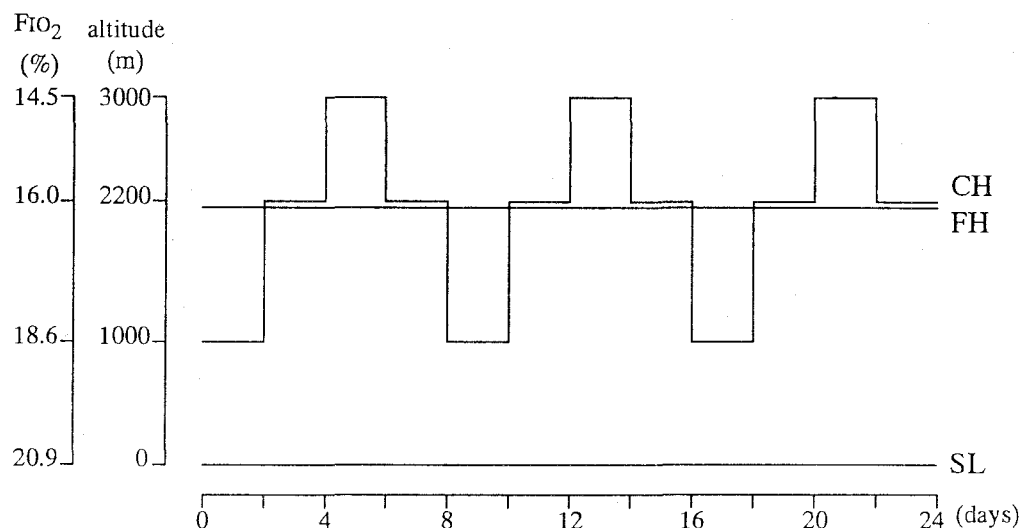


Figure 3-1. Experimental design of hypoxic environment. SL, sea level; FH, fixed hypoxic environment; CH, periodically changing hypoxic environment; FIO<sub>2</sub>, % O<sub>2</sub> in inspired gas.

## 2) 試料採取

24 日間の実験期間が終了し、最後の運動負荷から 24 時間以上経過後に、ペン Tobalbitaral 麻酔下でヒラメ筋を摘出して湿重量を測定した。筋は急速凍結後、-80℃で保存した。

### 3) 生化学的分析

左後肢から摘出して凍結したヒラメ筋は圧延して薄片化した後、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性と筋中のグリコーゲン含量を測定した。SDH はクエン酸回路にあって、コハク酸からフマル酸を生成する反応にあずかる律速酵素のひとつである。グリコーゲンはエネルギー産生に必要な貯蔵糖質であり、筋中ではグルコース 6-リン酸からフルクトース 6-リン酸に変換されて解糖系代謝経路に入り、筋収縮の直接的なエネルギー供給源となる。

SDH 活性の測定には、Shepherd らの方法の修正法によった [Shepherd et al., 1977]。ヒラメ筋サンプルの湿重量を測定し、その 100 倍量のバッファー (0.17 mol-リン酸緩衝液, 0.05 %-アルブミン含有, pH 7.4) を加えてホモジナイズする。各サンプルのホモジネート 100  $\mu$ l に 600 mM-コハク酸ナトリウム, 8 mM-ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム水溶液 100  $\mu$ l を加えて 37°C で 5 分保温する間に、コハク酸脱水素酵素によってコハク酸からフマル酸が生成する。3 mol-過塩素酸水溶液 100  $\mu$ l を加えて反応を停止させた後、3 mol-KOH を 100  $\mu$ l を加えて 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清 10  $\mu$ l を蛍光定量用のバッファー (0.1 mol-ヒドラジン水溶液, pH 9.2, 0.05 %-アルブミン, 0.3 mM-NAD) 3 ml と混合する。さらに 0.25 mg/ml-フマル酸ヒドラターゼと 5 mg/ml-リンゴ酸脱水素酵素の含有溶液 30  $\mu$ l を添加して室温で反応を進め、120 分後の光学的濃度を蛍光分光光度計 (日立製作所分光蛍光光度計 650-10 型) で測定し、各サンプルにおいて生成したフマル酸を定量して、コハク酸脱水素酵素活性を求める。

筋グリコーゲン量の測定には、van Handel によるアンスロン (anthrone) 法を用いた [van Handel, 1965]。ヒラメ筋サンプルの湿重量を測定し (10 mg 程度)、30 %-KOH を 1 ml 加えて 20 分間煮沸し、その後冷却する。硫酸ナトリウム飽和水溶液 100  $\mu$ l とエタノール 2.0 ml を加えて攪拌し、3,000 rpm で 20 分間遠心分離する。上澄み液を除去した後、D.H<sub>2</sub>O を 1 ml、さらにエタノール 2.0 ml を加えて、再度同様に遠心分離をおこなう。上澄み液を除去して、D.H<sub>2</sub>O を 50  $\mu$ l 加えて攪拌する。ここに、D.H<sub>2</sub>O と濃硫酸を 15 : 38 の体積比で混合した水溶液 100 ml に 0.15 g のアンスロンを添加して作成した溶液 3.0

m l を加えてさらに攪拌する。その後、90℃で 20 分間煮沸して冷却後、分光光度計（日立製作所ダブルビーム分光光度計 100-60 型）によってグリコーゲン濃度を定量する。

#### 4) 組織化学的分析

右後肢から摘出して凍結したヒラメ筋から厚さ 10  $\mu$  m の連続横断切片を作成し、ATPase 染色 [Brooke and Kaiser, 1970a] ならびに SDH 染色 [Nachlas et al., 1957] を施して筋線維組成を求めた。

### 3. 2 結果

Table 3-1. Body weights and soleus muscle weights

<i>trained group</i>	SL-T	FH-T	CH-T
Body weights			
at 7wk-age, g	295 $\pm$ 19	300 $\pm$ 21	301 $\pm$ 6
at 10wk-age, g	363 $\pm$ 26*	360 $\pm$ 22	369 $\pm$ 9
% increment	23 $\pm$ 1*	20 $\pm$ 3*	22 $\pm$ 1*
Soleus muscleweights,			
mg	153 $\pm$ 18	132 $\pm$ 19	142 $\pm$ 6
mg/100g BW	42 $\pm$ 5	37 $\pm$ 6	38 $\pm$ 1
<i>untrained group</i>	SL-C	FH-C	CH-C
Body weights			
at 7wk-age, g	324 $\pm$ 26	286 $\pm$ 10	284 $\pm$ 15
at 10wk-age, g	422 $\pm$ 42	376 $\pm$ 19	381 $\pm$ 37
% increment	30 $\pm$ 3	31 $\pm$ 5	34 $\pm$ 6
Soleus muscleweights,			
mg	167 $\pm$ 10	139 $\pm$ 28	144 $\pm$ 27
mg/100g BW	40 $\pm$ 5	37 $\pm$ 7	38 $\pm$ 10

Values are means  $\pm$  SD. BW, body weight. \*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from the untrained group.

### 1) 体重およびヒラメ筋重量

実験開始時（7週齢）と24日後の実験終了時（10週齢）の体重およびその間の体重増加率、ヒラメ筋の湿重量と体重100gに対する筋重量の相対値をTable 3-1に示した。体重の増加率はSL-T群、FH-T群およびCH-T群では20～23%の範囲にあったのに対して、SL-C群、FH-C群およびCH-C群では30～34%の増加率を示し、同一環境条件にある運動群と非運動群の間には有意差（ $p<0.05$ ）がみられ、運動群では体重増加が抑制された。生育環境条件による体重やその増加率に対する影響は認められなかった。また、ヒラメ筋の重量とその体重に対する相対値に群間の差はなかった。

### 2) コハク酸脱水素酵素活性

ヒラメ筋のコハク酸脱水素酵素（SDH）活性は環境条件や運動負荷の有無による差異は認められなかった（Table 3-2）。

Table 3-2. SDH activities and glycogen contents in the soleus muscle

<i>trained group</i>	SL-T	FH-T	CH-T
SDH activity, $\mu$ mol/g/min	$13.5 \pm 2.3$	$10.9 \pm 2.2$	$12.2 \pm 4.3$
glycogen content, mg/100g tissue wt.	$491 \pm 46^*$	$526 \pm 81$	$472 \pm 64$
<i>untrained group</i>	SL-C	FH-C	CH-C
SDH activity, $\mu$ mol/g/min	$13.3 \pm 1.8$	$13.6 \pm 2.2$	$12.3 \pm 1.8$
glycogen content, mg/100g tissue wt.	$417 \pm 43$	$443 \pm 99$	$386 \pm 64$

Values are means  $\pm$  SD. SDH, succinate dehydrogenase. \*Significantly different ( $p<0.05$ ) from SL-C group.

### 3) グリコーゲン量

ヒラメ筋のグリコーゲン含量は運動負荷した3群で増加し、同一環境条件の非運動群と比較してSL-T群では18%、FH-T群では19%およびCH-T群では22%の増加がみられた。生育環境条件の違いによる群間の差は認められなかった（Table 3-2）。

#### 4) 筋線維組成

ヒラメ筋の筋線維組成を Table 3-3 に示した。CH-T 群と CH-C 群の FOG 線維比率はそれぞれ 26.6%、24.3% を占めており、他の 4 群はいずれも FOG 線維比率が 20% に満たなかった。CH-T 群では SL-T 群と FH-T 群に比較して有意差 ( $p<0.05$ ) がみられた。同一環境条件下にある運動群と非運動群との間に差は認められなかった。

Table 3-3. Fiber type distributions in the soleus muscle

<i>trained group</i>	SL-T	FH-T	CH-T
Distribution, %			
SO type	83.3 ± 3.0	85.3 ± 4.2	73.4 ± 8.9 <sup>ab</sup>
FOG type	16.8 ± 3.0	14.7 ± 4.2	26.6 ± 8.9 <sup>ab</sup>
<i>untrained group</i>	SL-C	FH-C	CH-C
Distribution, %			
SO type	82.6 ± 8.7	80.3 ± 4.2	75.7 ± 9.1
FOG type	17.4 ± 8.7	19.7 ± 4.2	24.3 ± 9.1

Values are means ± SD. SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic. <sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SL-T group. <sup>b</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from FH-T group. No significant differences between trained and untrained groups.

### 3. 3 考察

実験実施前後の 24 日間の体重増加率には運動負荷による抑制の影響がみられたが、環境要因による影響は現れなかった (Table 3-1)。第 1 章や第 2 章に記したように、低圧環境に 2 週間または 10 週間にわたって常時曝露した場合には体重増加が抑制されたが (Table 1-1, 2-1 参照)、本実験での低酸素環境への曝露は 1 日 45 分という短時間の間欠的なものであったため、生体に対する環境ストレスとしての影響が小さかったことを反映すると推測される。



骨格筋の酸化系酵素活性が持久性トレーニングによって増加することはよく知られており [Holloszy, 1967; Gollnick et al., 1973]、また低酸素トレーニングによってクエン酸合成酵素 (CS) やコハク酸脱水素酵素 (SDH)、3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素 (HAD) の活性の増加がラットあるいはヒトの骨格筋で認められたことが報告されている [Terblanche et al., 1984; Taguchi et al., 1988; Terrados et al., 1988]。ただし Young らは、慢性的な低酸素環境曝露の場合と異なって、短期間での高所滞在の場合には酸化系酵素活性に変化がみられないことを報告している [Young et al., 1982]。本実験ではヒラメ筋の SDH 活性に運動負荷および間欠的低酸素曝露の影響は認められなかったが (Table 3-2)、これは低酸素曝露が間欠的であり、運動時間も 1 日 45 分間と短かったことが原因であると考えられる。

本実験では、運動を負荷した SL-T 群、FH-T 群と CH-T 群にグリコーゲン量の増加傾向が現れた (Table 3-2)。グリコーゲンはエネルギー産生基質であり、Gollnick らは持久性トレーニングによって筋中のグリコーゲン量が増加することを報告している [Gollnick et al., 1972, 1973]。一方、低酸素環境下では運動時に筋グリコーゲンの涸渇を遅延させるために、エネルギー産生基質として脂質が優先的に利用 (脂質酸化) されて、グリコーゲンの利用が抑制されることが明らかとなっている [Young et al., 1982, 1984; Terrados et al., 1988]。しかし、本実験では運動負荷した 3 群の筋グリコーゲン量に差はなく、間欠的低酸素曝露による影響はみられなかった (Table 3-2)。この原因として、本実験の運動強度が軽度であったためにグリコーゲン利用の抑制が必要となるまでに至らなかったこと、あるいは運動負荷した 3 群間の酸化系酵素活性に差がなく、グリコーゲン利用の抑制効果が現れるほどには酸化系代謝能が亢進していなかったことが考えられる。

本実験で最も興味を引くのは、短時間の間欠的な低酸素曝露であっても筋線維組成を変化させる可能性が示された点である。酸素濃度を 16.0% に固定した FH-T 群や FH-C 群ではヒラメ筋の筋線維組成に変化はみられなかった。しかし、酸素濃度を 18.6% から 14.5% の間で変動させた CH-T 群と CH-C 群では、SL-T

群と SL-C 群および FH-T 群と FH-C 群に比較すると、FOG 線維が増加して SO 線維が減少する傾向を示し、第 1 章および第 2 章において低圧環境下で観察されたヒラメ筋の筋線維組成と同様の変化を確認することができた (Table 3-3)。本実験に先立って、低圧チャンバーを用いて高度 2,200 m 相当の固定低圧環境または高度 1,000 m、2,200 m および 3,000 m の 3 段階に相当する低圧環境を 2 日ごとに変化させる変動低圧環境に 24 日間、常時曝露した実験を実施し、ラットのヒラメ筋では固定低圧環境と変動低圧環境の双方で FOG 線維比率の増加傾向が観察されている [森井ら, 1992]。この先行実験と本実験との最も大きな差異は低酸素環境への曝露時間にあり、これらの結果から判断して、低酸素環境への曝露時間が長くなれば固定低酸素環境下においてもヒラメ筋の筋線維組成に変化が生ずるものと推測される。したがって、短時間の間欠的な低酸素曝露という環境条件の下でヒラメ筋の筋線維にタイプ移行を引き起こすには、固定低酸素状態よりも変動低酸素状態の方が有効であり、また変動低圧環境下では筋組織の低酸素適応が速やかに進行すると考えられる。本実験において、固定低酸素環境下で SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行の発現がみられず、変動低酸素環境下でタイプ移行が発現した原因として、酸素濃度の最も低くなる 14.5% の環境条件に生体が順応するように進行し、低酸素状態が一旦緩和される 18.6% あるいは 16.0% の酸素濃度の期間では生体に厳しい低酸素負荷がかかることなくその順応が促進されること、あるいは酸素濃度を短期間に変化させることによって酸素濃度に対する感受性が亢進することなどが考えられる。第 1 章に記した実験においてヒラメ筋の筋線維組成で FOG 線維比率が最大 (SO 線維比率が最小) となったのが慢性的な低圧環境から常圧環境へ移行させた群 (HS 群) であったことや、高所登山法にみられる経験則 [島岡, 1991] などから照合すると、一定の低酸素環境下にあるよりも、生体に過重な負担とならない範囲で低酸素度を変動させて緊張と緩和を繰り返す方が、筋線維の適応が容易に確立され则认为られる。Levine と Stray-Gundersen によれば、長距離走者を被検者として、高度 2,500 m の高所に滞在してトレーニングを実施した場合よりも高度 2,500 m に滞在してトレーニングは高度 1,250 m に下降して実施した場合の方が、5,000 m 走時間の短縮や最

大酸素摂取量の増加などの身体パフォーマンスの改善が著しいことを示して、高所トレーニングにおける“living high-training low”の有効性を提案している [Levine and Stray-Gundersen, 1997]。この結果は、低酸素状態に迅速に順応して身体パフォーマンスを高めるには、低酸素度を緩和する期間を設定することの重要性を裏付けるものといえる。

間欠的な低酸素曝露が筋組織に及ぼす影響に関する報告としては、田中らが 2,600 m に相当する低圧環境に 1 日 8 時間の曝露を 5 週間にわたって実施し、ヒラメ筋と腓腹筋の CS 活性、SDH 活性および LDH 活性に明瞭な変化を認めていない [田中ら, 1997]。一方、Yoshino らは高度 5,000 m 相当の低圧環境に 1 日 2 時間の曝露を 2～11 日間実施した後に、骨格筋や心筋のグルタミン酸脱水素酵素活性の増加とヘキソキナーゼ (HK) 活性の減少を認めている [Yoshino et al., 1990]。しかしながら、これらの研究では低圧度や曝露時間、測定酵素の種類が異なるため、筋のエネルギー代謝の変化に特定の傾向を見い出すことは困難であり、また筋線維組成に関する分析はない。現時点では本実験のような極めて短時間の間欠的低酸素曝露と筋線維組成に関する研究報告はなく、短時間の間欠的低酸素曝露を継続することによって筋線維タイプを転換させることが可能であるかどうかを、低酸素度とその変動範囲、曝露時間や継続期間をさまざまに設定して、今後さらに検討を重ねる必要がある。

## 第 4 章

### 低圧環境への急性適応期における筋線維組成の経時的变化

第2章において、低圧性低酸素環境への曝露は骨格筋の筋線維組成を一様に変化させるものではなく、ヒラメ筋ではSO線維からFOG線維へのタイプ移行が生じるが、長指伸筋ではタイプ移行が発現しないというように、筋の種類によって変化パターンを異にする筋特異性があること、また低圧環境下でヒラメ筋に現れる筋線維のタイプ移行には、ヒラメ筋の特性である持続的な収縮活動を維持するのに適した酸化系代謝能を増進する変化であることが示唆された。一方、第2章と第3章において、持久性運動を負荷することで、筋活動にともなう酸素需要量の増大によって生体内に低酸素ストレスが引き起こされた場合には、筋線維組成に変化が生じないことを確認した。また低圧環境への曝露によってヒラメ筋に引き起こされる筋線維のタイプ移行の発現に対して、持久性運動の負荷が促進または抑制する作用は認められなかった。これらの結果から、持久性運動が筋組織に及ぼす影響は、筋線維のタイプ移行を伴わない範囲内での生理的応答、例えば末梢循環の促進や酵素活性の増進などによって、筋組織での酸素需給の均衡が保たれるものと考えられる。一方、低圧環境下での生活は、高度2,200 m相当という中高度の低酸素状態であっても筋線維のタイプ移行をみることから、筋組織では持久性運動の場合とは異なった機序による生理的応答が働くものと予測される。

生体を取り巻く外部環境の変動に対して、生体のホメオスタシスを維持し、適応を実現する調節機構の中心となるのは、自律神経系および内分泌系であることが知られている〔黒島, 1993〕。自律神経系のうち交感神経系の活動は、外部からの強い刺激を受けた際に現れる緊急反応 (emergency reaction) において典型的に観察され、心拍数・心拍出量の増加、熱産生やエネルギー基質の動員の促進など、エネルギー代謝の亢進を引き起こす。また交感神経系はアドレナリン作動性血管収縮線維の作用によって腹部臓器や四肢の皮膚の血管を収縮させる一方で、

コリン作動性血管拡張線維の作用や副腎髄質からのアドレナリン分泌を介したアドレナリン $\beta$ 受容体の作用によって冠血管や骨格筋の血管を拡張する。寒冷や低酸素といった環境下では、熱産生や呼吸・循環系の活動が亢進して基礎代謝量が增大するため、エネルギー代謝を促進する交感神経系の活動が亢進するほか、基礎代謝の維持に働く甲状腺ホルモンの分泌が亢進して、放熱促進や酸素消費の増加に関与する。また甲状腺ホルモンはアドレナリンの作用を増強し、交感神経・副腎髄質系の活動を亢進することが知られている〔伊藤と黒島, 1992〕。

甲状腺ホルモンの作用は多岐にわたり、発育や分化にも重要な役割をはたしているが、骨格筋に対する作用としては筋細胞を構成するミオシンタンパク質の分化に関する研究がこれまでに報告されている〔Ianuzzo et al., 1977; Izumo et al., 1986; Caiozzo and Haddad, 1996; Li and Larsson, 1997〕。Izumo らは、トリヨードサイロニン ( $T_3$ ) の過剰投与や甲状腺の摘出により実験的に甲状腺ホルモンの亢進状態または欠乏状態を作り出して、筋線維タイプの決定因子であるミオシン重鎖 (myosin heavy chain; MHC) をコードする mRNA の発現量に及ぼす影響を、心筋やヒラメ筋、長指伸筋、横隔膜などの筋ごとに詳細に検討している〔Izumo et al., 1986〕。この報告によると、甲状腺ホルモンが作用する MHC mRNA の発現パターンは筋の種類によって様々であり、筋特異性がみられる。そのうち、甲状腺ホルモン亢進下におけるヒラメ筋の MHC mRNA の発現量は、type I が減少して type II A が増加し、長指伸筋では type II B にやや増加がみられる程度でほとんど変化しない。また、Li と Larsson は  $T_3$  投与後のヒラメ筋と長指伸筋の MHC 組成比率を測定しており、ヒラメ筋では type I が減少し、type II A と type II X が増加したが、長指伸筋には有意な変化を認めていない〔Li and Larsson, 1997〕。

甲状腺ホルモンと MHC 組成に関して、特にこれらの研究報告に注目するのは、第 2 章に記したとおり、低酸素環境下においてヒラメ筋では SO 線維が減少して FOG 線維が増加し、長指伸筋では筋線維組成に変化がみられないという実験結果と極めて類似しているところにある。したがって、低酸素環境下で引き起こされる筋線維のタイプ移行には、甲状腺ホルモンの作用が何らかの影響を及ぼしてい

る可能性が予測される。そこで本章では、低圧環境下で筋線維タイプの移行が生じる初期段階にあたる急性適応期に焦点をおいて、筋線維組成と血清甲状腺ホルモンレベルの変化を追跡した。また、組織化学的には筋線維タイプの変化が確認されたが、MHC isoforms 組成を測定することによって分子レベルでの変化を確認するとともに、甲状腺ホルモン投与後の MHC isoforms 組成の変化を報告した Li と Larsson の実験結果との比較を試みた。

#### 4. 1 材料と方法

##### 1) 実験動物および飼育環境

実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 30 匹（日本チャールスリバー社）を用いて、8 週齢時点で低圧環境に曝露する群と常圧環境での飼育を継続する対照群とに分類し、週齢によって以下の 5 群（各群 n=6）を設定した。

C 0 群：8 週齢まで常圧環境下で生育した対照群

C 1 群：9 週齢まで常圧環境下で生育した対照群

C 2 群：10 週齢まで常圧環境下で生育した対照群

H 1 群：常圧環境下で生育後、8 週齢から 9 週齢までの 1 週間を低圧環境に曝露した群

H 2 群：常圧環境下で生育後、8 週齢から 10 週齢までの 2 週間を低圧環境に曝露した群

これらの実験群によって、低圧環境曝露後 1~2 週間の急性適応期における骨格筋の反応を経時的に検討した。低圧環境は低圧チャンバーを用いて 771 hPa（高度 2,200 m 相当）に設定した。その他の飼育条件に関する詳細は第 1 章に記したとおりである。

##### 2) 試料採取

実験期間の終了した群はペントバルビタール麻酔下で後肢よりヒラメ筋と長指伸筋を、また左副腎、心臓を摘出して湿重量を測定した。摘出した筋は急速凍結して保存した。腹大動脈より 4 cc 程度採血し、約 1 cc を血液学的分析に供し、残りは血清を内分泌学的分析に使用した。

### 3) 血液学的分析

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値を測定した [光田ら, 1990]。

### 4) 血清内分泌学的分析

甲状腺ホルモンの活性指標として、血清中の遊離サイロキシシン (Free T<sub>4</sub>)、遊離トリヨードサイロニン (Free T<sub>3</sub>) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) の濃度を測定した。甲状腺で産生された甲状腺ホルモンは、血中ではその大部分を甲状腺ホルモン結合タンパクと結合しているため、甲状腺ホルモン機能の評価には、生理活性を有する遊離型ホルモンが通常測定される [横山と長瀧, 1997]。Free T<sub>4</sub> 濃度と Free T<sub>3</sub> 濃度は、<sup>125</sup>I-標識抗 T<sub>4</sub> または抗 T<sub>3</sub> モノクローナル抗体 (日本コダックダイアグノスティックス社) をトレーサーとした競合反応形式の radioimmunoassay (RIA) 法によった [早川ら, 1994]。甲状腺刺激ホルモン活性は、<sup>125</sup>I-標識 TSH 抗体 (栄研化学社) を用いた immunoradiometric assay (IRMA) 法によった [柚山と田頭, 1992]。

### 5) 組織化学的分析

凍結した筋から作成した厚さ 10  $\mu$  m の連続横断切片には、ATPase 染色 [Brooke and Kaiser, 1970a]、SDH 染色 [Nachlas et al., 1957] および  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPD) 染色 [Wattenberg and Leong, 1960] を施した。 $\alpha$ -GPD 染色は、0.05 mol-Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に 0.02% -メナジオン、0.05% -NBT および 0.01 mol- $\alpha$ -グリセロリン酸二ナトリウムをそれぞれ加えた溶液に組織切片を浸潤させて、37℃で 40 分間震盪した。

染色切片の観察から、筋線維組成比率と筋線維タイプ別の平均横断面積および平均 SDH 活性を求めた。横断面積は画像処理装置 (ピラス社 LA535) とパーソナルコンピュータ (日本電気社 PC-9801RX) によって、基準線 (日本光学社) を画像に取り込み、その長さと画素数との対応を基にして、指定する 1 本の筋線維区画内の総画素数から面積を算出した。

### 6) ミオシン重鎖アイソフォーム分析

筋線維タイプを決定する上で重要な構成タンパク質であるミオシン重鎖アイソフォーム (MHC isoforms) の組成比率をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリル

アミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により、Devor と White の方法を修正して測定した [Devor and White, 1995]。

筋サンプルの湿重量を測定し、その 9 倍量のバッファー (62.5 mM-Tris-HCl, 2 mM-EDTA) を加えてホモジナイズした。各サンプルのホモジネートを 6 mol-Urea 含有の電気泳動用試料バッファーにて 5 倍希釈し、60℃で 10 分間加熱処理した後、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を電気泳動用試料バッファー (DTT 添加) で 5 倍から 7.5 倍に希釈して、SDS-PAGE に供した。成熟ラットの場合、MHC isoforms は分子量 200 kDa 周辺において、分子量の小さい順に type I、type II B、type II X、type II A の 4 種類に分離される。

30%-glycerol を含む 7%-gel に各サンプルをアプライし、15℃に保温しながら 100 V 定電圧で約 20.5 時間泳動し、その後ゲルを coomassie brilliant blue R-250 にて染色した。脱色後のゲルをクロマトスキャナー (島津製作所 CS-910) にかかけ、そのデータをシステムコントローラー (東ソー社 SC-8020) に転送して各バンドの染色強度を測定し、MHC isoforms の含量を求めて、組成比率を算出した。

## 4. 2 結果

### 1) 体重および組織重量

体重および心臓、副腎、ヒラメ筋、長指伸筋の湿重量を Table 4-1 に示した。体重と組織重量の全ての値で、同一週齢にある C 1 群と H 1 群および C 2 群と H 2 群との間に有意な差はなかった。また、8 週齢から 10 週齢に至る各重量値の増加傾向に、常圧環境と低圧環境との違いによる影響はみられなかった。

### 2) 血液性状

赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値は常圧環境下の C 0 群、C 1 群および C 2 群に変化はなかった。低圧環境下にある H 1 群と H 2 群では増加が認められ、C 0 群に比較するとヘモグロビン濃度ではそれぞれ 10% および 19% 増加した (Table 4-2)。



Table 4-1. Body weights, organ weights and muscle weights

	C0	C1	C2	H1	H2
Body weight, g	256±9	297±4 <sup>a</sup>	342±16 <sup>ab</sup>	295±3 <sup>a</sup>	342±23 <sup>ab</sup>
Heart,					
mg	799±53	889±82 <sup>a</sup>	994±58 <sup>ab</sup>	852±31	956±81 <sup>ab</sup>
mg/100g BW	312±18	299±25	291±14 <sup>a</sup>	289±10 <sup>a</sup>	279±18 <sup>a</sup>
Adrenal,					
mg	24±3	27±3	31±4 <sup>a</sup>	27±4	28±5
mg/100g BW	9.6±1.0	9.2±0.9	9.1±1.2	9.0±1.5	8.2±1.5
Soleus muscle,					
mg	140±10	142±18	163±18 <sup>a</sup>	139±13	181±15 <sup>ab</sup>
mg/100g BW	55±4	48±6 <sup>a</sup>	48±6 <sup>a</sup>	47±4 <sup>a</sup>	53±6
EDL muscle,					
mg	138±11	162±14 <sup>a</sup>	191±17 <sup>ab</sup>	167±14 <sup>a</sup>	191±11 <sup>ab</sup>
mg/100g BW	54±4	54±5	56±6	57±5	56±4

Values are means ± SD. BW, body weight; EDL, extensor digitorum longus.

<sup>a</sup>Significantly different (p<0.05) from C0 group. <sup>b</sup>Significantly different (p<0.05) from C1 or H1 group. No significant differences between age-matched groups.

Table 4-2. Blood parameters

	C0	C1	C2	H1	H2
RBC, ×10 <sup>4</sup> /μℓ	709±33	755±27 <sup>a</sup>	765±60	809±13 <sup>*a</sup>	840±68 <sup>a</sup>
Hb, g/dℓ	14.8±0.5	15.2±0.5	15.4±1.0	16.3±0.1 <sup>*a</sup>	17.6±1.0 <sup>*ab</sup>
Hct, %	47.2±1.6	48.4±1.5	47.8±2.7	52.2±0.5 <sup>*a</sup>	54.3±3.5 <sup>*a</sup>

Values are means ± SD. RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit.

<sup>\*</sup>Significantly different (p<0.05) from the age-matched control group. <sup>a</sup>Significantly different (p<0.05) from C0 group. <sup>b</sup>significantly different (p<0.05) from H1 group.

### 3) 血清中の甲状腺ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン濃度

血清中の遊離サイロキシシン (Free T<sub>4</sub>)、遊離トリヨードサイロニン (Free T<sub>3</sub>) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) の濃度は全ての群間に差はなく、環境条件や

週齢による変化はみられなかった (Table 4-3)。

Table 4-3. Serum thyroid hormone and thyroid-stimulating hormone levels.

	C0	C1	C2	H1	H2
Free T <sub>4</sub> , ng/d l	2.2±0.2	2.1±0.2	2.2±0.1	2.1±0.1	2.2±0.4
Free T <sub>3</sub> , pg/m l	4.3±0.6	4.3±0.3	4.2±0.8	4.0±0.5	4.4±0.9
TSH, $\mu$ U/m l	0.87±0.18	1.14±0.66	1.43±1.24	1.35±0.53	1.43±0.76

Values are means  $\pm$  SD. T<sub>4</sub>, thyroxine; T<sub>3</sub>, triiodothyronine; TSH, thyroid-stimulating hormone. No significant differences between all groups.

#### 4) 筋線維組成

ヒラメ筋の筋線維組成を Table 4-4 に、長指伸筋の筋線維組成を Table 4-5 に示した。ヒラメ筋の筋線維組成は同一週齢にある C 1 群と H 1 群および C 2 群と H 2 群との間に差はなかった。常圧環境下にある C 0 群、C 1 群および C 2 群では、SO 線維比率の平均値はそれぞれ 59.5%、63.8%、64.2%と増加し、FOG 線維比率はそれぞれ 33.7%、26.9%、25.3%と減少する傾向を示した (Figure 4-1)。低圧環境下にある H 1 群と H 2 群では逆に SO 線維比率の平均値はそれぞれ 61.5%、59.5%と減少して FOG 線維比率がそれぞれ 24.2%、27.4%と増加し、また INT 線維の比率 (H 1 群 14.4%と H 2 群 13.1%) が C 0 群 (6.8%) に比較して有意 ( $p<0.05$ ) に増加した (Figure 4-2)。長指伸筋では常圧下の C 0 群、C 1 群および C 2 群において 8 週齢から 10 週齢までに変化はみられなかった (Figure 4-3)。H 1 群には FOG 線維比率の増加と FG 線維比率の減少がみられた (Figure 4-4)。

#### 5) 筋線維横断面積

ヒラメ筋、長指伸筋ともに同一週齢にある C 1 群と H 1 群および C 2 群と H 2 群の間に差はなかった。また 8 週齢から 10 週齢へと週齢が上がるにつれて、筋線維横断面積は各筋線維タイプで増加を示した (Table 4-4, 4-5)。ヒラメ筋の各筋線維タイプの平均横断面積は、C 1 群を除いた他の群では INT 線維が最も小

さく、SO 線維で最大値を示した。各群の INT 線維の平均横断面積の値を 100 とした場合の SO 線維の平均横断面積の相対値は C 0 群 123、C 1 群 130、C 2 群 127、H 1 群 124、H 2 群 129 であり、FOG 線維の平均横断面積の相対値は C 0 群 97、C 1 群 111、C 2 群 108、H 1 群 113、H 2 群 109 であり、筋線維タイプ別にみた横断面積比にも変化はなかった。長指伸筋の各筋線維タイプの平均横断面積を比較すると、すべての群で SO 線維が最も小さく、FG 線維で最大値を示した。各群の SO 線維の平均横断面積の値を 100 とすると、FOG 線維の平均横断面積の相対値は C 0 群 142、C 1 群 145、C 2 群 132、H 1 群 135、H 2 群 126 であり、FG 線維の平均横断面積の相対値は C 0 群 260、C 1 群 279、C

Table 4-4. Fiber type distributions, cross-sectional area and SDH activities in single fibers in the soleus muscle

	C0	C1	C2	H1	H2
Distribution, %					
SO type	59.5 ± 5.7	63.8 ± 6.5	64.2 ± 5.7	61.5 ± 6.7	59.5 ± 4.3
INT type	6.8 ± 2.8	9.3 ± 3.2	10.5 ± 4.5	14.4 ± 4.8 <sup>a</sup>	13.1 ± 5.0 <sup>a</sup>
FOG type	33.7 ± 6.9	26.9 ± 5.8	25.3 ± 3.9 <sup>a</sup>	24.2 ± 6.8 <sup>a</sup>	27.4 ± 5.1
CSA, $\mu\text{m}^2$					
SO type	2792 ± 257	3126 ± 303	3366 ± 387 <sup>a</sup>	3304 ± 576	3603 ± 397 <sup>a</sup>
INT type	2275 ± 302	2408 ± 541	2642 ± 445	2655 ± 476	2797 ± 381 <sup>a</sup>
FOG type	2205 ± 279	2668 ± 347 <sup>a</sup>	2857 ± 458 <sup>a</sup>	2998 ± 448 <sup>a</sup>	3038 ± 179 <sup>a</sup>
SDH activity, O.D.					
SO type	0.53 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.04
INT type	0.62 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.65 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.05
FOG type	0.61 ± 0.01	0.64 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.02	0.66 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>a</sup>

Values are means ± SD. SDH activities are given in relative values of optical densities.

CSA, cross-sectional area; SDH, succinate dehydrogenase; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; INT, intermediate between SO and FOG.

<sup>a</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from C0 group. No significant differences between age-matched groups.

2 群 269、H 1 群 281、H 2 群 243 であり、筋線維タイプ別の横断面積比に差はなかった。

#### 6) 単一筋線維 SDH 活性

単一筋線維の平均 SDH 活性はヒラメ筋および長指伸筋の各タイプにおいて特定の変化はなく、各群の SDH 活性の平均値は、ヒラメ筋では SO 線維 0.53~0.55、INT 線維 0.62~0.65、FOG 線維 0.61~0.66 の範囲に、長指伸筋では SO 線維 0.58~0.63、FOG 線維 0.60~0.62、FG 線維 0.43~0.47 の範囲にあった (Table 4-4, 4-5)。

Table 4-5. Fiber type distributions, cross-sectional area and SDH activities in single fibers in the EDL muscle

	C0	C1	C2	H1	H2
Distribution, %					
SO type	5.8±1.5	5.0±1.2	4.3±2.4	5.5±0.9	4.1±1.9
FOG type	41.4±4.3	45.4±3.4	44.7±4.3	47.5±3.1 <sup>a</sup>	43.2±2.6 <sup>b</sup>
FG type	52.8±4.0	49.6±3.8	51.0±6.3	47.0±2.8 <sup>a</sup>	52.8±3.0 <sup>b</sup>
CSA, $\mu\text{m}^2$					
SO type	1155±125	1227±153	1504±252 <sup>ab</sup>	1319±114 <sup>a</sup>	1545±181 <sup>ab</sup>
FOG type	1642±274	1781±189	1981±346	1787±189	1942±189
FG type	3003±384	3424±599	4046±639 <sup>a</sup>	3701±663 <sup>a</sup>	3762±406 <sup>a</sup>
SDH activity, O.D.					
SO type	0.63±0.04	0.60±0.04	0.62±0.05	0.58±0.02 <sup>a</sup>	0.61±0.03
FOG type	0.62±0.05	0.60±0.04	0.61±0.04	0.61±0.02	0.60±0.03
FG type	0.47±0.05	0.44±0.04	0.44±0.03	0.43±0.03	0.44±0.04

Values are means ± SD. SDH activities are given in relative values of optical densities.

CSA, cross-sectional area; SDH, succinate dehydrogenase; EDL, extensor digitorum longus; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; FG, fast-twitch glycolytic. <sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from C0 group. <sup>b</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from C1 or H1 group. No significant differences between age-matched groups.



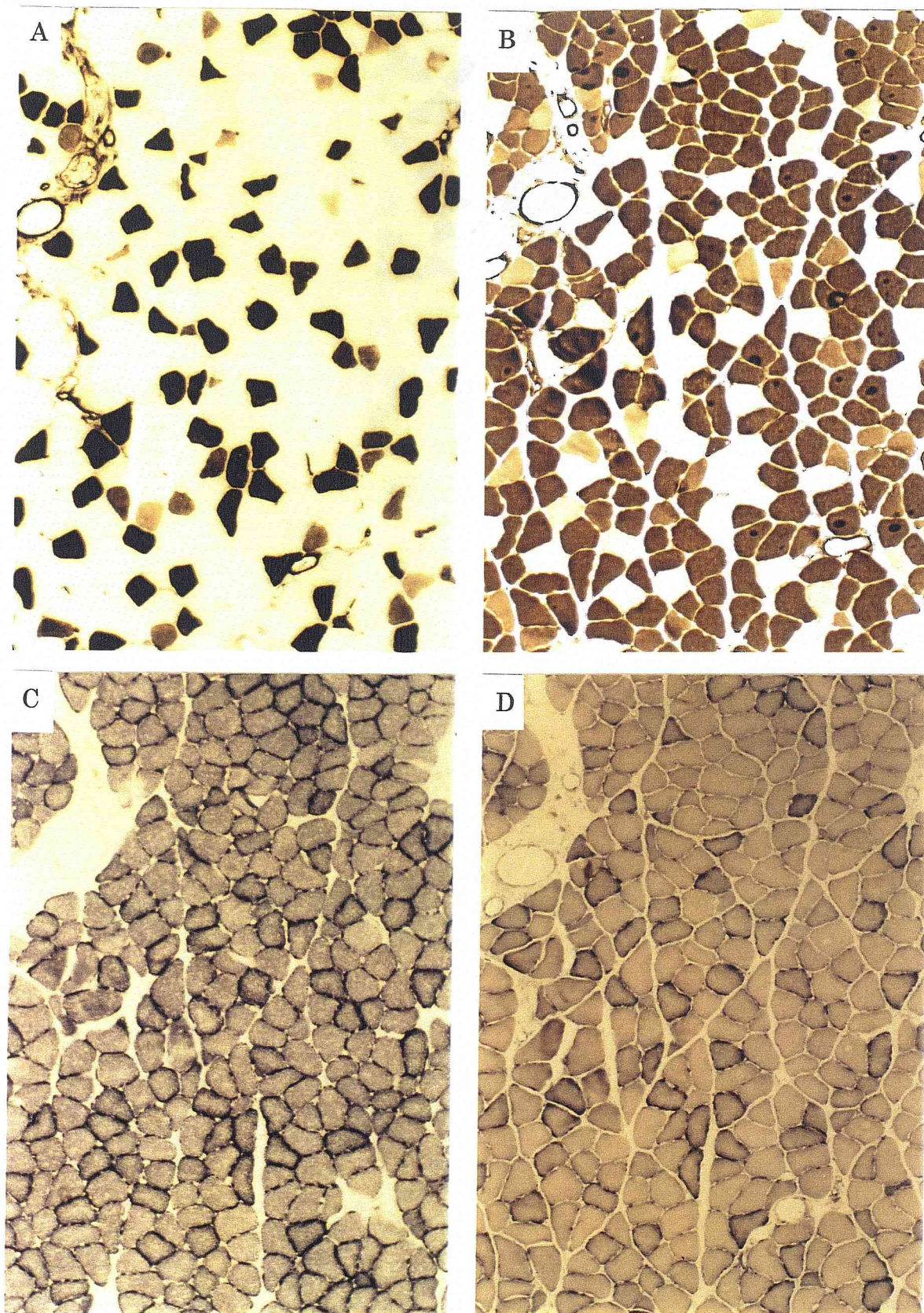


Figure 4-1. Serial cross sections of the soleus muscle taken from a C1 rat stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), at pH 4.3 (B), succinate dehydrogenase (C), and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (D). Scale bar = 100  $\mu$  m.



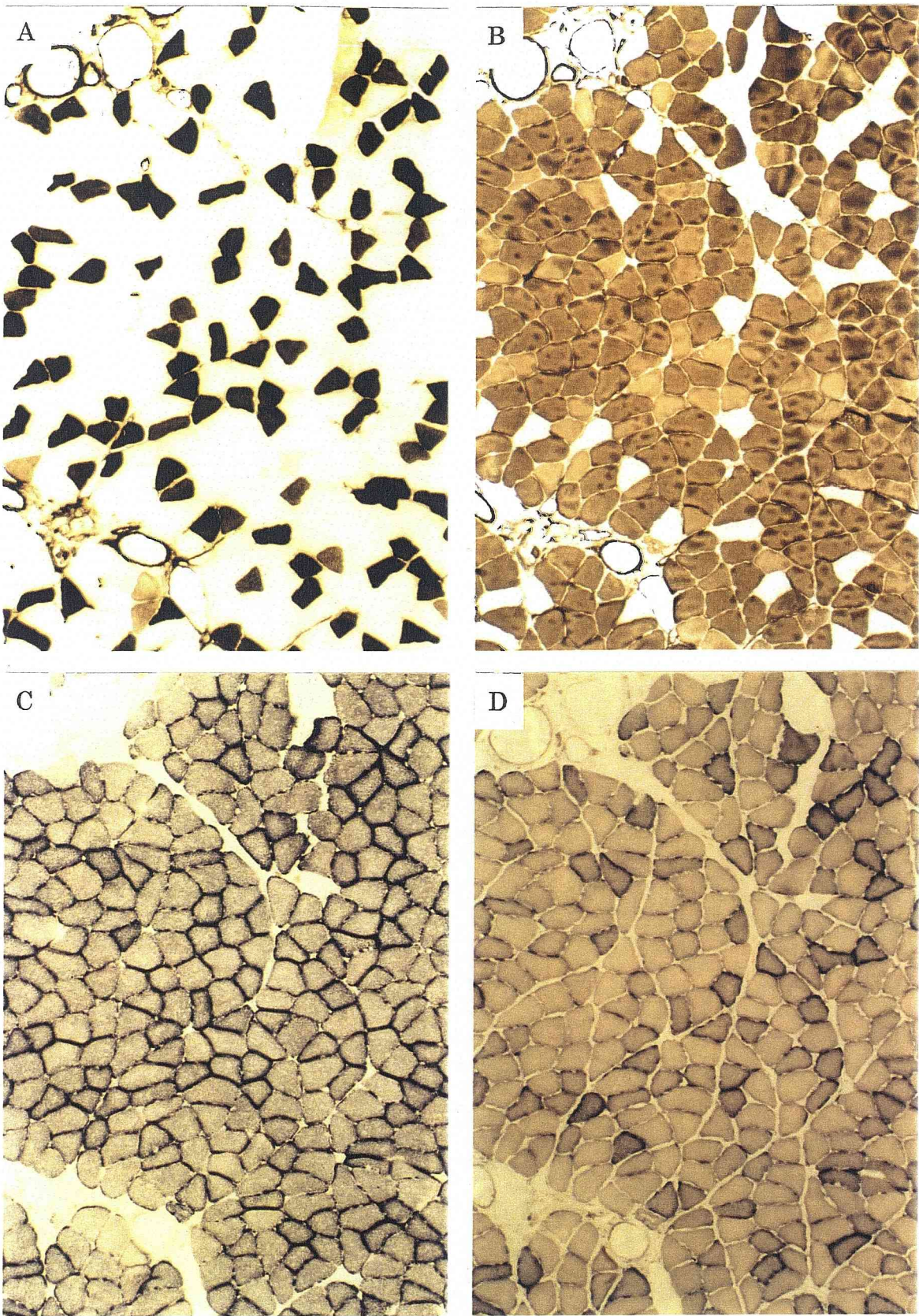


Figure 4-2. Serial cross sections of the soleus muscle taken from a H1 rat stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), at pH 4.3 (B), succinate dehydrogenase (C), and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (D). Scale bar = 100  $\mu$  m.



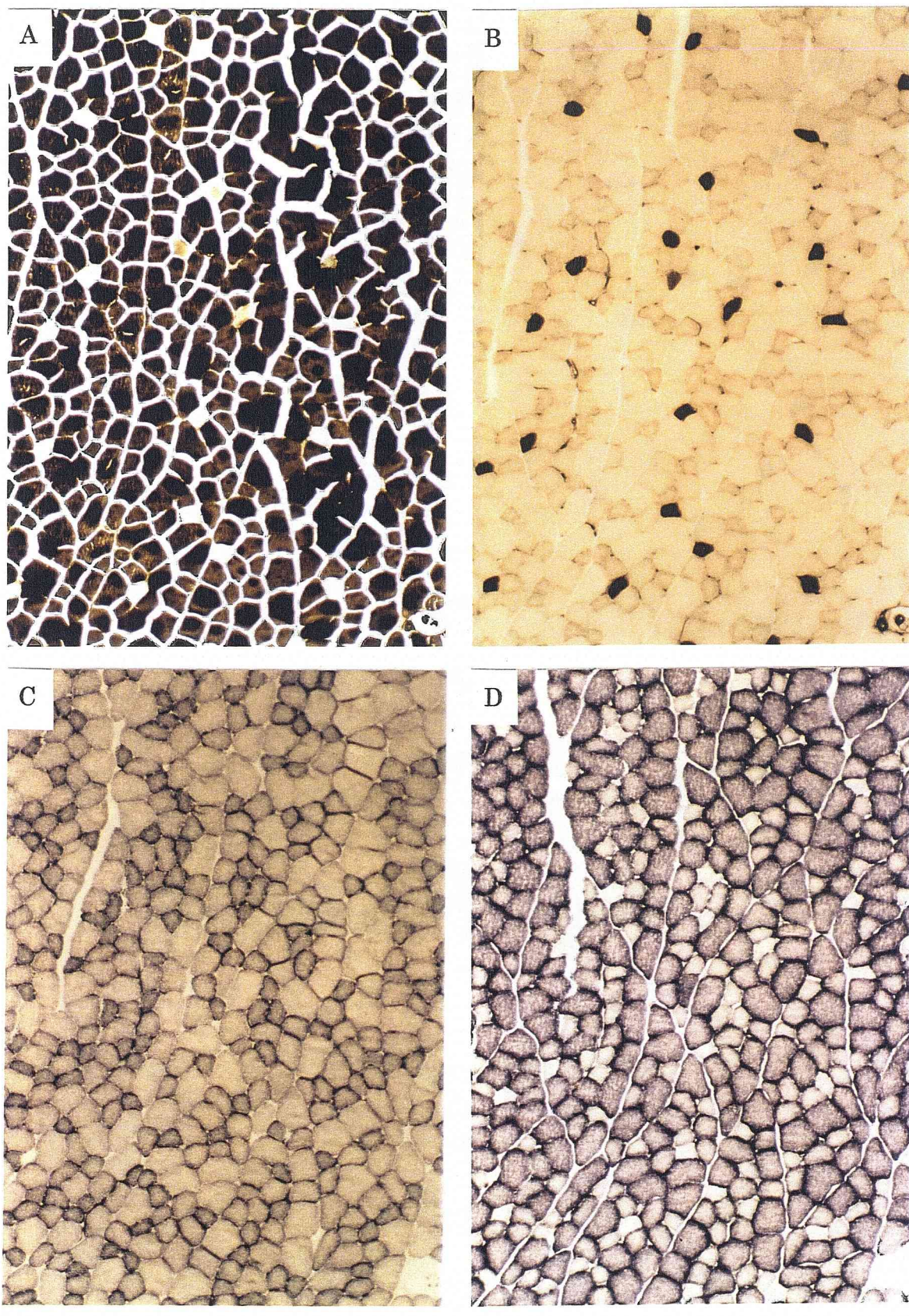


Figure 4-3. Serial cross sections of the extensor digitorum longus muscle taken from a C1 rat stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), at pH 4.4 (B), succinate dehydrogenase (C), and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (D). Scale bar = 100  $\mu$  m.



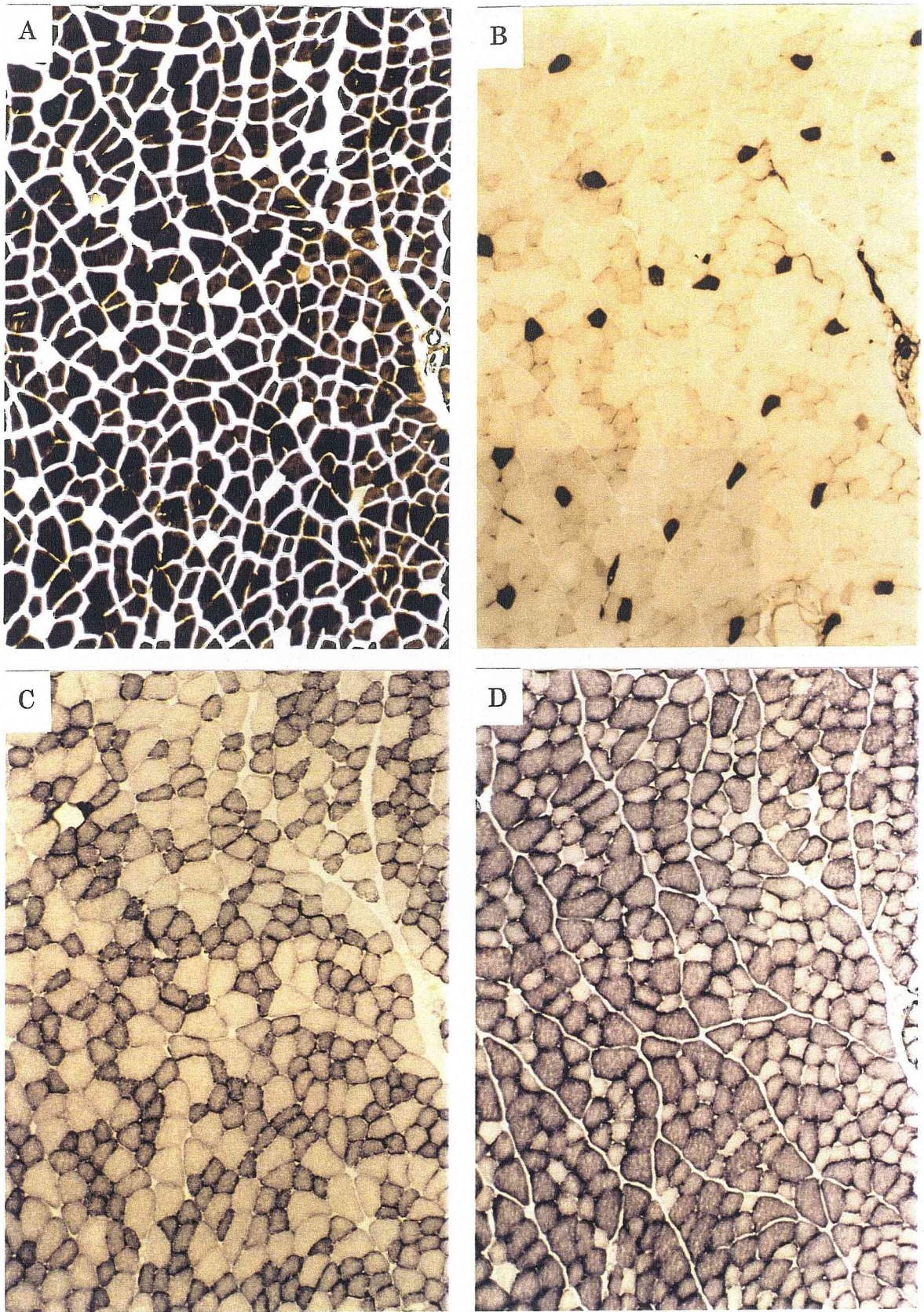


Figure 4-4. Serial cross sections of the extensor digitorum longus muscle taken from a H1 rat stained for ATPase preincubated at pH 10.4 (A), at pH 4.4 (B), succinate dehydrogenase (C), and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase (D). Scale bar = 100  $\mu$  m.



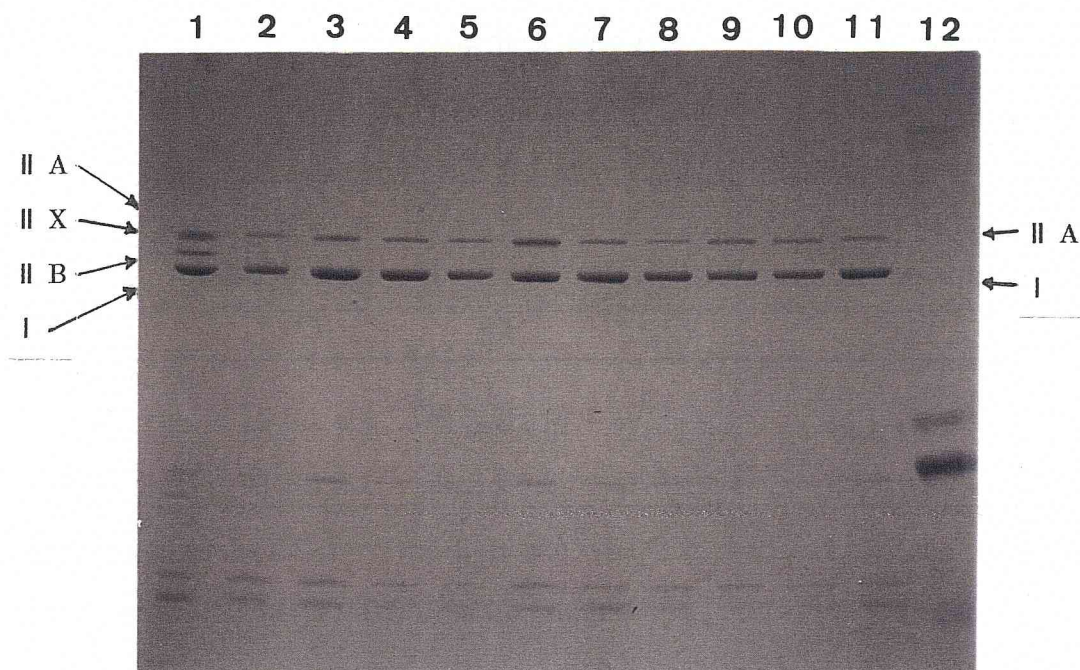


Figure 4-5. A coomassie brilliant blue-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gel revealing myosin heavy chain isoforms in the soleus muscles. Lane 1, a mixture of the soleus and extensor digitorum longus muscle homogenates; lane 2 and 7, C0 rats; lane 3 and 8, C1 rats; lane 4 and 9, H1 rats; lane 5 and 10, C2 rats; lane 6 and 11, H2 rats; lane 12, a molecular weight standard. In the soleus muscles of all groups, only type I and II A were evident.

#### 7) ミオシン重鎖アイソフォーム組成

筋線維の構成タンパク質であるミオシン重鎖アイソフォーム (MHC isoforms) の組成は、ヒラメ筋では type I と type II A とで占められ、本実験では type II X と type II B を検出しなかった (Figure 4-5)。ヒラメ筋の MHC isoforms の組成比率は、Table 4-6 に示すとおり、常圧環境下にある C 0 群、C 1 群および C 2 群では type I の平均値がそれぞれ 68.5%、75.8%、78.1%と週齢があがるにつれて増加し、type II A はそれぞれ 31.5%、24.2%、21.9%と減少した。一方、低圧環境下にある H 1 群と H 2 群は、ともに type I の平均値が約 75%、type II A が約 25%であり、組成比率に変化はみられなかった。

Table 4-6. Myosin heavy chain isoform distributions in the soleus muscle

	C0	C1	C2	H1	H2
Distribution, %					
type I	68.5±7.2	75.8±5.8	78.1±4.4 <sup>a</sup>	74.6±5.7	74.7±7.5
type II A	31.5±7.2	24.2±5.8	21.9±4.4 <sup>a</sup>	25.4±5.7	25.3±7.5

Values are means±SD. Type II B and type II X were not detected in all groups.

<sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from C0 group.

#### 4. 3 考察

本実験では、各群の体重や各組織の重量に環境条件による差はなかった。固形飼料の1日当たり平均摂食量は、常圧環境下ならびに低圧環境下の各群ともに25~26 g/匹の範囲にあって差はなく、低圧環境に曝露した H 1 群と H 2 群において環境変化に対する適応が順調であったものと推察される。このことは、H 1 群と H 2 群の血液の酸素運搬能を示す赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値の各指標が増加して、先行研究 [万木, 1987.; 浅野, 1991; Ward et al., 1995] で報告されている急性低酸素適応期に出現する典型的な血液性状の変化を示し、血液・循環系の低酸素適応が推移したことからも裏付けられる。

筋線維タイプを決定する最も重要な因子である MHC isoforms には、ラットの

場合、胎生期および新生児期にのみ特異的に発現する embryonic タイプと neonatal タイプを除くと、通常は I、II A、II X、II B の 4 種類が同定されている [Mahdavi et al., 1986; Bar and Pette, 1988]。序章に記したとおり、SO 線維は MHC I、FOG 線維は主に MHC II A、FG 線維は主に MHC II B で構成される。MHC II X の性格については現在研究が進行中であり、組織化学的には FOG 線維と FG 線維の双方に含まれている [的場ら, 1995]。ヒラメ筋において特異的に発現する INT 線維は、組織化学的性質が SO 線維と FOG 線維の中間タイプであり、MHC isoforms 組成においても MHC I と MHC II A との両タイプの混在型である。INT 線維は ATPase 染色などの組織化学的反応パターンに幅があり、SO 線維に近いもの（いわゆる type I C）や、ほぼ中間から FOG 線維に近いもの（type II C）があって、こうした反応の幅は INT 線維を構成する MHC I と MHC II A の混合比率に依存するものと推測される。このような INT 線維の性格や、出生後数日間は骨格筋を構成する筋線維が全て INT 線維で占められていることなどから、INT 線維は SO 線維または FOG 線維に分化する以前の未分化状態、あるいは SO 線維から FOG 線維または FOG 線維から SO 線維への移行過程にある線維と考えられている [和田と勝田, 1995]。

本実験において常圧環境下にある C 0 群、C 1 群、C 2 群のヒラメ筋の筋線維組成は、SO 線維比率の平均値が順に 59.5%、63.8%、64.2%、FOG 線維比率の平均値が順に 33.7%、26.9%、25.3%であり、8 週齢から 10 週齢へと成長するにつれて SO 線維比率が減少し、FOG 線維比率が増加した (Table 4-4)。ラットの生後 90 日までに至るヒラメ筋の筋線維組成を経時的に測定した岡田らの報告によると、INT 線維比率は生後 3 日目までは 100% を占めるが、生後 10 日目には約 50% に急減し、以後も減少を続けて、生後 90 日ではわずかにみられる程度となる。SO 線維比率は生後 10 日目には急増して約 50% を占めるようになり、以後漸増して生後 90 日には 90% 以上となる。FOG 線維は生後 15 日目から発現し、生後 60 日には約 20% にまで増加するが、以後は減少に転じて、生後 90 日には 5 % 程度にまで漸減する [岡田ら, 1981]。したがって、C 0 群、C 1 群、C 2 群にみられた SO 線維比率が増加して FOG 線維比率が減少する傾向は、岡

田らが示した成長期における筋線維組成の変化と合致するものであり、常圧環境下にある FOG 線維と INT 線維の多くは、成長するにしたがい SO 線維へタイプ移行すると考えられる。一方、低圧環境下にある H 1 群と H 2 群では、SO 線維比率が 61.5% から 59.5% へ減少し、FOG 線維比率が 24.2% から 27.4% へ増加した (Table 4-4)。この変化は、常圧環境下にある C 0 群、C 1 群、C 2 群にみられた発育期の変化とは逆行する傾向であり、また第 1 章に記した急性的に低圧環境に曝露した群 (SH 群) のヒラメ筋にみられた変化とは同じ傾向であった。したがって、低圧環境下における筋線維のタイプ移行は、通常の発育期に現れる SO 線維が増加する方向とは逆に、SO 線維および INT 線維から FOG 線維への方  
向に発現することが再確認された。H 1 群と H 2 群の筋線維組成にみられたもう一つの特徴としては、INT 線維比率の平均値がそれぞれ 14.4%、13.1% と高値を示し、C 0 群 (6.8%) と比較すると 2 倍以上 ( $p<0.05$ ) に増加したことである (Table 4-4, Figure 4-2)。H 1 群と H 2 群で INT 線維比率の増加をみたことは、低酸素環境下で SO 線維と FOG 線維間でのタイプ移行の発現が活性化していることを示唆すると考えられる。

筋線維タイプと筋線維内で発現する MHC isoforms との対応に関しては、先述したとおり、SO 線維では MHC I が、FOG 線維では主に MHC II A が発現しており、INT 線維は MHC I と MHC II A の混在型である [Staron and Pette, 1986; 和田と勝田, 1995]。本実験のヒラメ筋における MHC isoforms は、SDS-PAGE の結果、すべての群で MHC I と MHC II A の 2 種類に分画された (Table 4-6)。MHC isoforms 組成比率は、常圧環境下にある C 0 群、C 1 群、C 2 群では、MHC I 比率の平均値がそれぞれ順に 68.5%、75.8%、78.1% であり、MHC II A 比率の平均値がそれぞれ 31.5%、24.2%、21.9% であった。常圧環境下における MHC isoforms 組成比率は、週齢が上がるにつれて MHC I の増加と MHC II A の減少をみており、発育期にみられる SO 線維の増加と FOG 線維の減少という組織化学的に観察された傾向 (Table 4-4) と一致した。一方、低圧環境下にある H 1 群と H 2 群では、9 週齢から 10 週齢にかけて、MHC I と MHC II A の比率に変化はなく (Table 4-6)、常圧環境下で発育期に現れた

MHC I の増加と MHC II A の減少の傾向は認められなかった。

これらのヒラメ筋における筋線維組成と MHC isoforms 組成の分析結果をまとめると、発育期のヒラメ筋筋線維組成において、常圧環境下では SO 線維とその構成要素である MHC I の増加を示すが、低圧環境下では SO 線維と MHC I の増加が抑制され、むしろ FOG 線維や INT 線維に増加が認められることから、低酸素刺激が SO 線維から INT 線維を介して FOG 線維にタイプ移行すると考えられる。

本実験の全ての群にみられるとおり、SO 線維に比較すると、FOG 線維は平均横断面積が小さく、ミトコンドリア密度を反映する平均 SDH 活性が高い (Table 4-4)。したがって、低酸素環境下で引き起こされる SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行には、SO 線維の筋細胞内において筋原線維を構成するタンパク質の分解が亢進して横断面積が減少し、この横断面積の減少またはミトコンドリア容量の増加によってミトコンドリア容量密度 (および SDH 活性) が増加するという過程を経て、組織化学的な性質が FOG 線維に転換することが想定される。この観点から、SO 線維と FOG 線維間の移行過程にあると考えられる INT 線維の組織化学的な性質に関して、筋線維横断面積と筋線維内のミトコンドリア分布を反映する SDH 活性とを座標軸とした散布図 (Figure 4-6) から分析した。Figure 4-6 をみると、すべての群において INT 線維の分布は SO 線維と FOG 線維の分布の境界域に重なっている。このうち、常圧環境下にある C 2 群の筋線維分布は、SDH 活性の高い FOG 線維から INT 線維、SO 線維の順に各タイプが 3 層状に広がって分布しているのに対して、低圧環境下にある同週齢の H 2 群では筋横断面積  $2000 \sim 3500 \mu\text{m}^2$  の範囲で FOG 線維、INT 線維および SO 線維の分布の重なりが C 2 群に比較すると大きくなっている。H 2 群では、この 3 種類の筋線維タイプの分布が重なる領域で、低酸素刺激によって引き起こされるタイプ移行が活性化されているものと推測される。H 2 群における SO 線維の平均横断面積は  $3603 \mu\text{m}^2$  であり (Table 4-4)、タイプ移行が発現していると考えられる筋線維の領域 (筋横断面積  $2000 \sim 3500 \mu\text{m}^2$  の範囲) はそれより横断面積が小さい。このことから、低圧環境下でヒラメ筋に生じる SO 線維から FOG 線維へのタイ

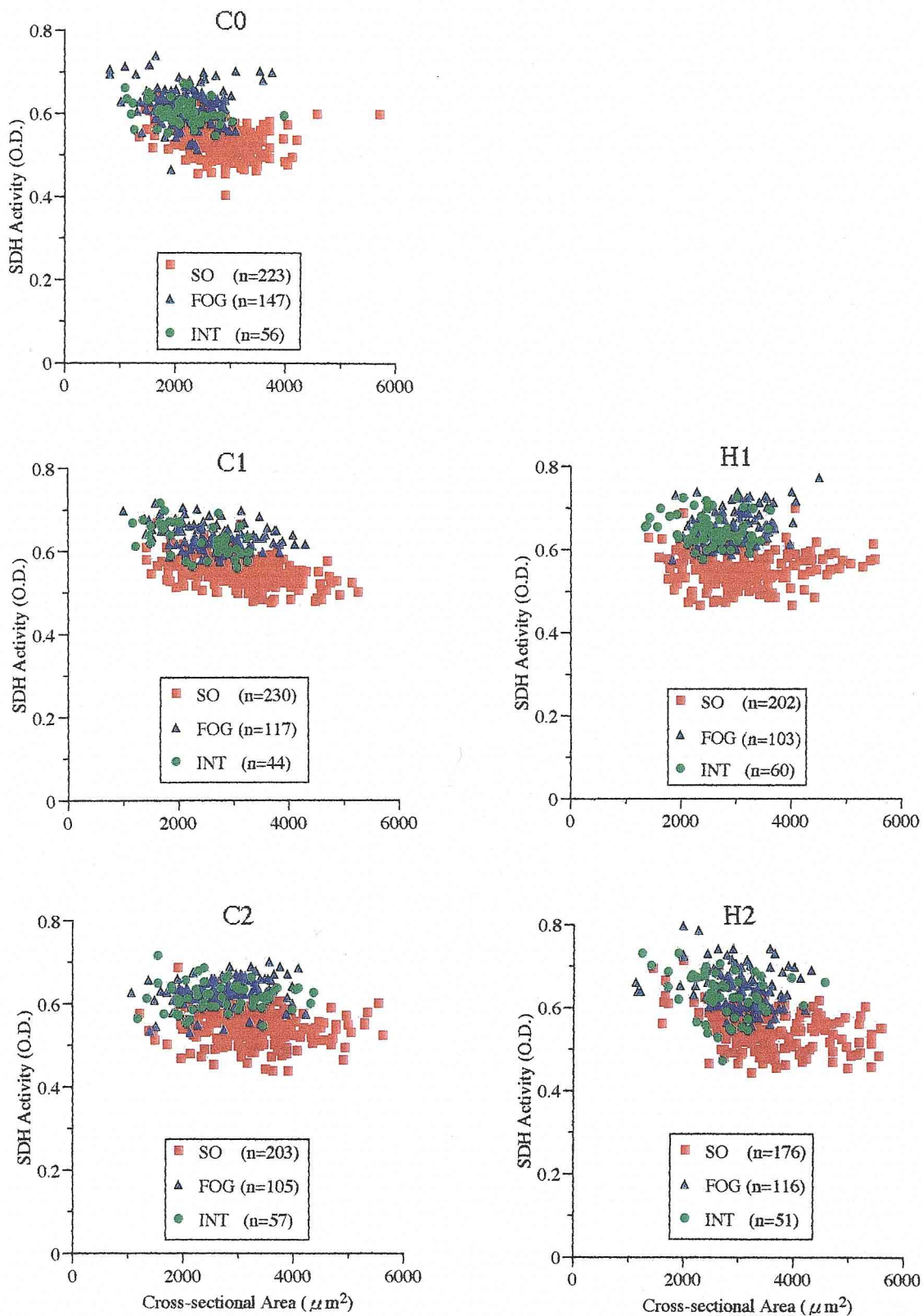


Figure 4-6. Relationships between cross-sectional areas and SDH activities in the soleus muscle fibers. SDH, succinate dehydrogenase; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; INT, intermediate between SO and FOG.



プ移行は、筋横断面積の分布からみると横断面積が平均値に満たない SO 線維において選択的に発現することが示唆される。このような横断面積の比較的小さい SO 線維は、毛細血管から酸素供給を受ける上では有利となるため、酸化系代謝能の高まる FOG 線維への移行が可能になるものと考えられる。

本実験で、筋線維のタイプ移行との関連性を想定した甲状腺ホルモンには、筋組織に対してタンパク質代謝を促進し、ミトコンドリア容量を増加させる作用のあるほか [佐久間, 1999; Winder et al., 1975]、先に記したように MHC isoforms の分化に影響を及ぼす [Izumo et al, 1986]。H 2 群では SO 線維のうち横断面積の小さい筋線維にタイプ移行が発現していると考えられるが、これには SO 線維を構成する MHC I などの既存の筋タンパク質の分解が亢進して、新たに MHC II A などの筋タンパク質が合成されるタンパク質代謝が活発におこなわれているために横断面積が縮小（または発育期における横断面積の肥大化を抑制）した結果を反映しているのではないかと考えられる。また、筋原線維を構成する筋タンパク質の分解促進は、相対的に筋線維内のミトコンドリア容量密度を増加させて SDH 活性を亢進させる効果がある。SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行時にみられるこのような組織化学的な性質の変化と、甲状腺ホルモンが筋組織に作用するタンパク質異化による筋横断面積の減少やミトコンドリア容量の増加には、関連性のあることが予測される。甲状腺ホルモンは低酸素環境下において、基礎代謝量の増加や骨髄での赤血球生成に関与し [Malgor et al, 1975]、低圧環境適応において重要な機能を担っていることとも合わせて考慮すると、低酸素環境下で引き起こされる SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行の反応機序に、甲状腺ホルモンが作用する可能性は高いと考えられる。

このように筋線維タイプ移行にみられる低酸素ストレスの影響と甲状腺ホルモン作用に共通性がみられることから、本実験では血清中の甲状腺ホルモン濃度を測定したが、低圧環境下にあった H 1 群および H 2 群の甲状腺ホルモン濃度に変化は認められなかった (Table 4-3)。低酸素あるいは寒冷のような基礎代謝に影響を及ぼす環境変化に遭遇した場合の甲状腺ホルモンの動態は、一般的に初期の 48 時間以内までは分泌量が増加するが、その後は甲状腺ホルモンの増加が下

垂体からの甲状腺刺激ホルモンの分泌に対して抑制的に作用（ネガティブ・フィードバック）するため、甲状腺ホルモンの分泌量は急速に通常レベルに復帰する。さらに低酸素や寒冷の状態が継続する場合には、末梢組織における受容体の増加などによって甲状腺ホルモンの感受性が高まるため、甲状腺からのホルモン分泌量は通常レベルよりもむしろ低下するといわれている [Galton, 1972; 黒島, 1993]。したがって、本実験で血清サンプルを採取した時期が低圧環境曝露の1週間後と2週間後であったため、その時点での血清中の甲状腺ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン濃度には差異がなかったと考えられる。甲状腺ホルモンの受容体は主に細胞内の核とミトコンドリアにあって、甲状腺ホルモンの作用が発現するまでに至る時間が長く、代謝促進作用が現れるまでに、 $T_3$ では18~36時間、 $T_4$ では24~48時間かかるといわれており [黒島, 1993]、低圧環境下で甲状腺ホルモンが作用して細胞内の核受容体やミトコンドリア受容体からの情報伝達を介したタンパク質の分解・合成やエネルギー産生の亢進が実際に発現するのは、低圧曝露の初期にみられる甲状腺ホルモンの分泌量の増加が収束した後（約48時間以降）になると予測される。

Li と Larsson は、トリヨードサイロニン ( $T_3$ ) を4週間または8週間投与したラットのヒラメ筋では有意にMHC Iが減少し、MHC II Aが増加したほか、通常ではほとんど発現していないMHC II Xをわずかではあるが観察している [Li and Larsson, 1997]。今回の実験で、低圧環境下にあるH 1群とH 2群にみられたMHC Iで構成されるSO線維が減少してMHC II Aで構成されるFOG線維が増加するという組成比率の変化は、甲状腺ホルモン作用の亢進時にみられる変化と同じである。ただし本実験で実施したSDS-PAGEでは、H 1群とH 2群のヒラメ筋からMHC II Xは分画されず、Li と Larsson が甲状腺ホルモン投与時に観察したMHC II Xの発現はみられなかった。先述したように、低圧環境下では低圧曝露初期には甲状腺ホルモンの分泌は増加するが、48時間以後の分泌量は通常レベルに復する一方で、末梢組織において甲状腺ホルモン受容体の作用が増進する生理的变化が生じると考えられているのに対して、Li と Larsson の実験は4週間または8週間の長期間に及ぶ $T_3$ の過剰投与であり、通常の生理的



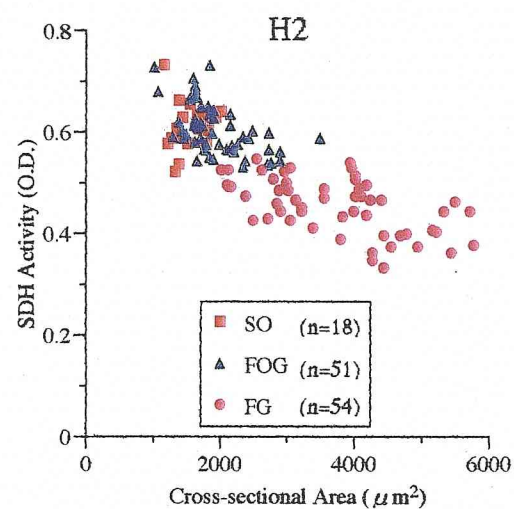
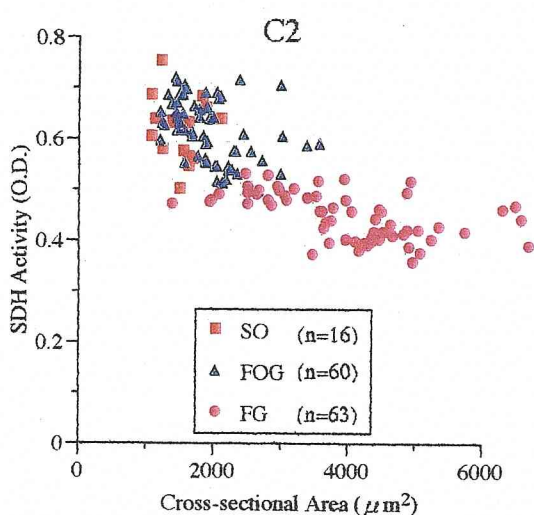
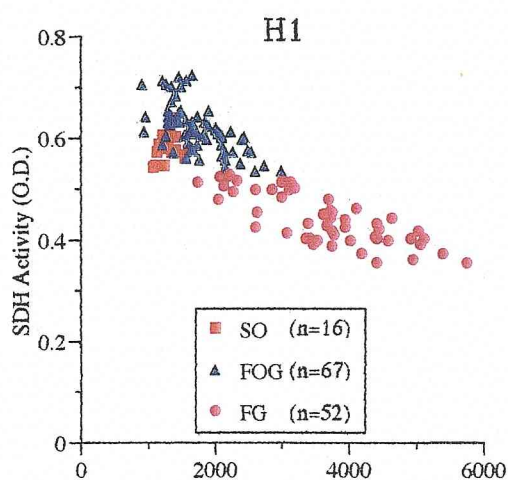
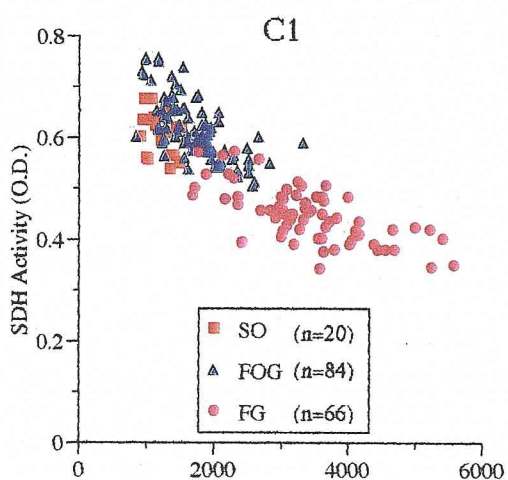
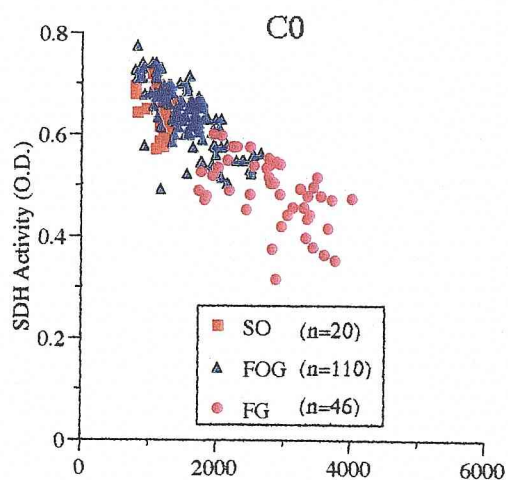


Figure 4-7. Relationships between cross-sectional areas and SDH activities in the extensor digitorum longus muscle fibers. SDH, succinate dehydrogenase; SO, slow-twitch oxidative; FOG, fast-twitch oxidative glycolytic; FG, fast-twitch glycolytic.

変動範囲を超える状態にあったため、通常発現しない MHC II X が検出されたのではないかと推測される。ただし、本実験の低圧曝露期間は 2 週間以内という短期間であり、長期間にわたる低圧曝露後には MHC II X が発現する可能性も考えられるため、長期間の低酸素環境下における MHC isoforms 組成を検討する必要がある。

本実験において、長指伸筋では、すべての群の筋線維組成に特段の差異は認められず (Table 4-5)、第 2 章に記した低圧曝露実験と同様に低圧環境が筋線維組成に及ぼす影響は観察されなかった。また長指伸筋の筋線維における横断面積と SDH 活性の平均値 (Table 4-5)、および横断面積と SDH 活性との関係から筋線維タイプ別に各群の筋線維の分布を表した Figure 4-7 から特定の変化はみられなかった。長指伸筋は生後 20 日には INT 線維はほぼ消失し、SO、FOG、FG の各線維の比率は以後ほとんど変化せず、ヒラメ筋よりも早期に分化を収束する [岡田ら, 1981]。長指伸筋はつま先の挙上という特定の動作に働く筋であり、歩行の開始とともに筋線維組成が早期に分化して安定化し、速筋線維である FOG 線維と FG 線維とで 95%以上の組成比率を占めるようになるのは、長指伸筋が担う動作の遂行に対して合目的的であるといえる。このような収縮・代謝特性をもつ長指伸筋に対して、低圧曝露という環境変化は、筋の動作様式や代謝様式に直接的な影響を与える要因とはならないため、筋線維組成を変化させるに至らないと考えられる。

他方、ヒラメ筋は姿勢保持に働く抗重力筋であり、重力の影響下にある自らの身体の重みに抗してバランスを調整するために持続した緊張をしいられ、特定の動作に関わる筋ではない。ヒラメ筋に要求されるこのような収縮特性や疲労耐性は高い酸化系代謝能によって維持されるが、それには十分な酸素を供給しうる活発な末梢循環が不可欠である。Hilton らによると、ヒラメ筋の血管床における血流量は速筋である腓腹筋や前脛骨筋、長指伸筋の平均値と比較して安静時で 3.7 倍であり、最大血流許容量も 2.8 倍に達する。また、一般的に運動時には筋の血流量は 4 倍以上に増加するが、ヒラメ筋の場合は安静時・運動時の血流量にほとんど差がない [Hilton et al., 1970]。これらの測定結果は、ヒラメ筋の代謝にお

ける末梢循環の重要性を裏付けるとともに、低圧性低酸素という循環系に重大な影響を与える環境要因は、長指伸筋などの速筋の場合と異なり、ヒラメ筋の代謝に直接的な影響が及ぶことを示唆する。低圧環境下において、ヒラメ筋のように筋線維組成に SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行が認められる筋と、長指伸筋のように筋線維組成に変化が生じない筋とが現れ、低圧刺激に対する筋の反応が異なる原因のひとつとして、タイプ移行を示す筋は、筋収縮に必要な代謝様式において酸素が供給される末梢循環系に依存する度合いが大きいためであると考えられる。

## 第 5 章

### 低圧環境下における運動トレーニングの至適低圧度

低酸素環境下でヒラメ筋に発現する筋線維タイプの SO 線維から FOG 線維への移行は、筋線維レベルでのエネルギー産生機構における酸化系および解糖系代謝能を高める適応性変化であることを、これまで主に組織化学的解析方法によって考察してきた。第 3 章では、間欠的低酸素曝露によって酸素濃度を規則的に変動させたラット（CH-T 群および CH-C 群）のヒラメ筋に筋線維組成の変化が見い出されたが、ヒラメ筋全体をホモジナイズして生化学的に測定したコハク酸脱水素酵素活性には変化が現れなかった。したがって、これまでの実験で観察された筋線維レベルでの代謝特性の変化が、はたして筋全体の代謝能や生体のパフォーマンスにどの程度反映するかについては十分明らかにされていない。

従来、高所トレーニングに関する研究によると、高度 1,500 m から 3,000 m の低酸素環境下による持久性トレーニングの実施によって、最大酸素摂取量の増加や赤血球の酸素運搬能の増大、運動時の乳酸生成の抑制、筋の水素イオン緩衝能の増大などがみられ、これら呼吸・循環系から末梢の筋組織に至る総合的な適応性変化が全身性持久運動能力の改善に資すると報告されている [浅野, 1991, 1994]。

本章では、これまでの実験（第 1、2、4 章）で筋線維組成の変化を確認した高度 2,200 m 相当の低圧環境と、Taguchi らの先行研究 [Taguchi et al., 1985] で筋線維組成の変化を観察した高度 4,000 m 相当の低圧環境とを設定して、低圧環境が生体全体のパフォーマンスに及ぼす影響を比較検討した。

#### 5. 1 材料と方法

##### 1) 実験動物および飼育環境

5 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット（船橋農場製）25 匹を、飼育環境条件

と持久性運動の負荷によって以下の4群を設けた。

SC 群：海面レベルでの自然状態（1,011 hPa）で飼育し、運動を負荷しなかった対照群（n = 5）

SS 群：海面レベルでの自然状態（1,011 hPa）で飼育した運動負荷群（n = 10）

2HS 群：高度 2,200 m 相当の低圧環境下（771 hPa）で飼育した運動負荷群（n = 5）

4HS 群：高度 4,000 m 相当の低圧環境下（617 hPa）で飼育した運動負荷群（n = 5）

これらの環境条件下で5週齢から10週齢までの5週間に亘って飼育した。

持久性運動負荷として、36℃に保温したアクリル製水槽中で水泳トレーニングを1日に30分間、1週間につき6日の頻度で5週間に亘って実施した。なお、アクリル製水槽内の空気を減圧することにより、運動中においても2HS群と4HS群ではそれぞれの低圧環境を維持した。今回の実験において、持久性運動として水泳トレーニングを採用したのは、次項に記す持久性パフォーマンスの評価として最大持久時間を測定する上で、走行運動よりも水泳運動の方が疲労困憊に至る被験動物の状態を正確に把握することができることによる。

## 2) 持久性パフォーマンスの測定

5週間のトレーニング期間の最後に、持久性パフォーマンステストとして水泳運動によって疲労困憊（水面浮上を試み、3回試行しても可能でなくなった状態）に至るまでの最大永続時間を大気圧下（1,011 hPa）で測定した。なお180分を超えて水泳運動を持続したラットについては、その時点でテストを終了した（テストデータでは180分として処理）。

## 3) 試料採取

実験期間終了後、ペントバルビタール麻酔下でヒラメ筋と長指伸筋を摘出して急速凍結後、-80℃で保存した。

## 4) 生化学的分析

左後肢から摘出して凍結した筋サンプルは圧延して薄片化した後、Shepherd

らの方法 [Shepherd et al., 1977] の修正法によりコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性を、また van Handel によるアンスロン法 [van Handel, 1965] を用いて筋中のグリコーゲン含量を測定した。

## 5. 2 結果

### 1) 体重

実験期間終了後 (10 週齢時) の体重は、SC 群、SS 群、2HS 群、4HS 群の順にそれぞれ  $368 \pm 18$  g、 $317 \pm 17$  g、 $315 \pm 20$  g、 $314 \pm 29$  g (mean  $\pm$  SD) であり、非運動群である SC 群の体重の平均値と比較して、運動を負荷した SS 群、2HS 群、4HS 群の体重は 14~15% の範囲で減少 ( $p < 0.05$ ) を示した。また、SS 群、2HS 群、4HS 群の 3 群間には差はなかった。

### 2) コハク酸脱水素酵素活性

ヒラメ筋のコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性の平均値は 2HS 群で最高値 ( $20.5 \mu\text{mol/g/min}$ ) を示し、SC 群 ( $11.3 \mu\text{mol/g/min}$ ) と 4HS 群 ( $12.5 \mu\text{mol/g/min}$ ) との間には有意差 ( $p < 0.05$ ) があつた。また SS 群の SDH 活性 ( $17.0 \mu\text{mol/g/min}$ ) も SC 群に比べて有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した (Table 5-1)。

Table 5-1. SDH activities and glycogen contents

	SC	SS	2HS	4HS
<i>soleus</i>				
SDH activity, $\mu\text{mol/g/min}$	$11.3 \pm 1.0$	$17.0 \pm 4.5^a$	$20.5 \pm 1.1^a$	$12.5 \pm 0.9^c$
glycogen content, mg/100g tissue wt.	$430 \pm 92$	$443 \pm 89$	$393 \pm 116$	$408 \pm 46$
<i>EDL</i>				
SDH activity, $\mu\text{mol/g/min}$	$8.2 \pm 1.3$	$12.4 \pm 3.9$	$18.5 \pm 3.8^{ab}$	$10.1 \pm 0.5^{ac}$
glycogen content, mg/100g tissue wt.	$521 \pm 98$	$708 \pm 123^a$	$672 \pm 74^a$	$710 \pm 57^a$

Values are means  $\pm$  SD. SDH, succinate dehydrogenase; EDL, extensor digitorum longus. <sup>a</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from SC group. <sup>b</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from SS group. <sup>c</sup>Significantly different ( $p < 0.05$ ) from 2HS group.

長指伸筋における SDH 活性の平均値も、2HS 群で最高値 ( $18.5 \mu \text{ mol/g/min}$ ) を示し、他の 3 群すべてに対して有意 ( $p<0.05$ ) に増加した (Table 5-1)。

### 3) グリコーゲン量

筋中のグリコーゲン量は、ヒラメ筋では各群間に差はみられなかった (Table 5-1)。長指伸筋では、運動を負荷しなかった SC 群と比較して運動負荷した SS 群、2HS 群、4HS 群でグリコーゲン量の平均値は 29～36% の範囲で増加 ( $p<0.05$ ) を示した (Table 5-1)。

### 4) 持久性パフォーマンス

水泳運動による持久性パフォーマンステスト (泳続時間) の結果を Table 5-2 に示した。4 群の中では 2HS 群が最高値を示し、180 分以上の泳続時間を示したラットが 2 匹あった。4HS 群では 180 分以上水泳を持続できたラットが 2 匹あった一方で、残りの 3 匹は全て 30 分以下であり、テスト結果は両極端に分かれた。SS 群の値は 50～127 分の範囲にあり、180 分以上水泳運動を持続したラットはなかった。SC 群の泳続時間は 5 匹すべてが 20 分以下であり、最も低いテスト結果となった。

Table 5-2. Performance time of swimming test

	SC	SS	2HS	4HS
time, min	$15 \pm 4$	$94 \pm 31^a$	$170 \pm 13^{ab}$	$86 \pm 86$
(range)	(11-20)	(50-127)	(150-180)	(18-180)

Values are means  $\pm$  SD. <sup>a</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SC group.

<sup>b</sup>Significantly different ( $p<0.05$ ) from SS group.

## 5. 3 考察

本実験では、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性と持久性パフォーマンスに環境条件の差異による影響が認められた。SDH 活性の平均値はヒラメ筋、長指伸筋ともに非運動群である SC 群で最も低く、SS 群、2HS 群、4HS 群に持久性トレーニングによる骨格筋の酸化系酵素活性の上昇効果 (Holloszy, 1967; Gollnick et

al, 1973) が認められた。ただし、水泳トレーニングを実施した3群間においてもSDH活性の増加には差があり、ヒラメ筋および長指伸筋ともに2HS群でSDH活性は最高値を示し、4HS群が運動負荷した3群中、最も低かった。酸化系酵素の含まれるミトコンドリアの筋細胞内密度は、細胞を取り巻く毛細血管密度と強い相関のあることが報告されている [Poole and Mathieu-Costello, 1996]。したがって、筋組織のミトコンドリアは、末梢循環から筋組織に供給される酸素量に見合った容量密度で存在すると考えられている。低圧環境下では体内での呼吸・循環系が改善されて、酸素供給が効率的におこなわれるようになるが、さらに低圧度が増すと、酸素供給が筋細胞の需要を満たすことができなくなる。本実験において高度4,000 m相当下で水泳トレーニングを実施した4HS群の酸化系酵素活性の上昇が低かったのは、低圧度が増して呼気中の酸素分圧が海面レベルの約60% (高度2,200 mにおける約80%) にまで低下して、筋組織に供給される酸素量が制限されたため、ミトコンドリア容量密度の増加が抑制されたことによるものと推測される。他方、高度2,200 m相当下で水泳トレーニングを実施した2HS群では、呼気中の酸素分圧は海面レベルの約76%であり、この程度の呼気酸素分圧の低下分は赤血球酸素運搬能の亢進、毛細血管網やミオグロビンの発達などの低圧適応によって補償され [浅野, 1991; Ward et al, 1995]、血液・循環系および末梢組織において酸素供給効率化の効果を最大に活用して酸素量を十分に確保することが可能であったため、筋組織のミトコンドリア容量密度が発達して酸化系酵素活性の上昇が最大になったと考えられる。先行研究では、Terblunche らが1,750 m相当、Terrados らが2,300 m相当の中程度の低圧環境でミトコンドリア酵素活性に増加を認めているが [Terblanche et al., 1984; Terrados et al., 1988]、一方でYoung らは高度4,300 mではミトコンドリア活性に変化がなかったことを報告しており [Young et al., 1982]、これらの研究報告は本実験結果を裏付けるものである。

泳続時間が長いラット、すなわち持久力があるラットは、SDH 酵素活性が高い傾向がみられ、2HS 群で最も高い相関が得られた。2HS 群では5匹全てが150分以上の泳続時間を示した。一方、4HS 群は泳続時間の平均値はSS 群と同レベ



ルであったが、個体差は極めて大きかった。4HS 群 5 匹の泳続時間は、2 匹が 180 分に到達したのに対して、残り 3 匹は全て 30 分未満であり、低圧環境へ適応したラットと適応不全のラットとに二分化された。

各群の SDH 活性と持久性パフォーマンスの変化傾向が類似していたことから、ヒラメ筋と長指伸筋の別に SDH 活性と泳続時間との関係を Figure 5-1 に示した。SS 群は 10 匹のラット全てが 180 分以内にパフォーマンステストを終了していたため単回帰分析をおこない、ヒラメ筋、長指伸筋ともに SDH 活性と水泳運動による持久時間との間に有意な相関 ( $p < 0.005$ ) がみられた。

Figure 5-1 において、2HS 群の 5 匹が示す値はヒラメ筋、長指伸筋の双方ともすべて SS 群の回帰直線より上方に位置している。このことは、筋の酸化系酵素活性の増加に加えて、低圧環境下で獲得したトレーニングに対する低圧適応能が常圧下におけるトレーニング効果以上に持久性パフォーマンスを向上させていることを示唆する。他方、4HS 群の SDH 活性レベルはヒラメ筋で  $11.5 \sim 13.7 \mu \text{mol/g/min}$ 、長指伸筋で  $9.2 \sim 10.5 \mu \text{mol/g/min}$  の範囲にあつて 5 匹ともほとんど差異がなかったにもかかわらず、泳続時間は SS 群の回帰直線をはさんで上下に分かれた。4HS 群では低圧適応の効果を得たものと、逆に常圧下での非運動群である SC 群のレベルにまで失調するものとの対比が示される結果となった。高所トレーニングの効果について必ずしも一致した結果を得られない原因として、低圧適応には個体差が大きく、オーバートレーニングにおちいる場合のあることは従前より指摘されている [浅野, 1994]。本実験において 4HS 群にみられた持久性パフォーマンスの二極化傾向は、そのことを如実に表しているように思われる。

高所におけるエネルギー産生経路に関して、代謝様式の変化、すなわち酸化系経路が優勢となるか解糖系経路が優勢となるかのバランスは、高度によって異なる [Ward et al., 1995]。高所トレーニングに示されるように、中高度の高所環境では酸化系代謝が亢進し、解糖系代謝は不変であるか、または抑制される。高度 6,000 m を超える高峰登山では、解糖系代謝は不変であるが、酸化系代謝は減弱する。このような代謝様式の転換がどの程度の高度で起きるかについては明確ではないが、人類の居住限界である 5,200~5,300 m 以下の高度にあると考えら

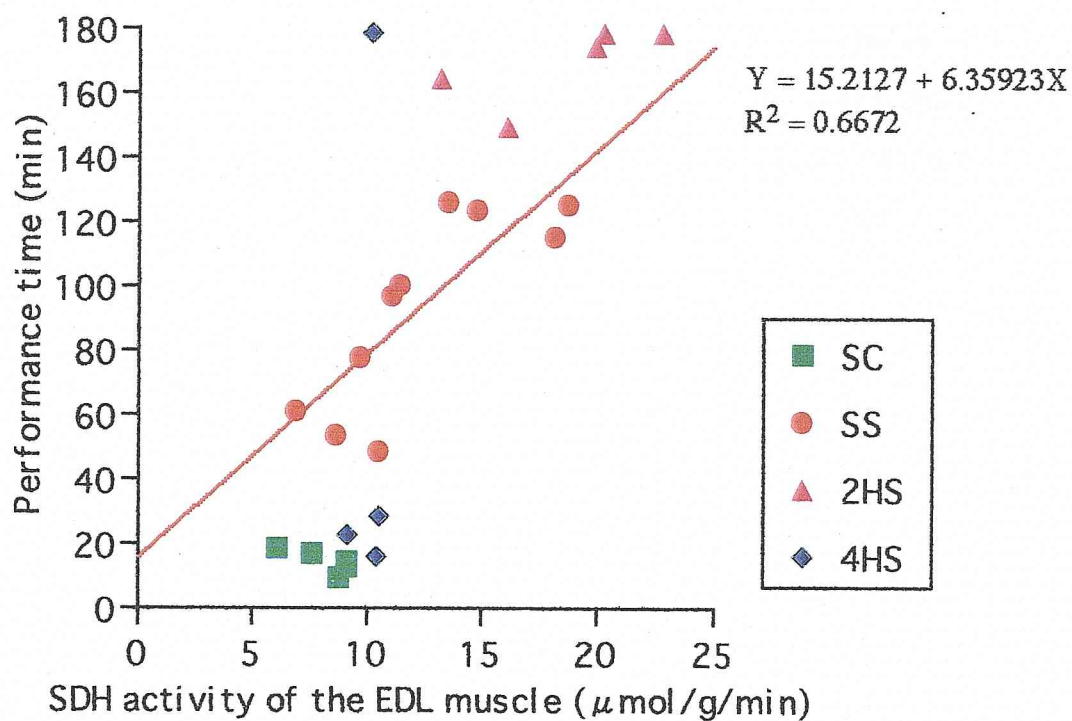
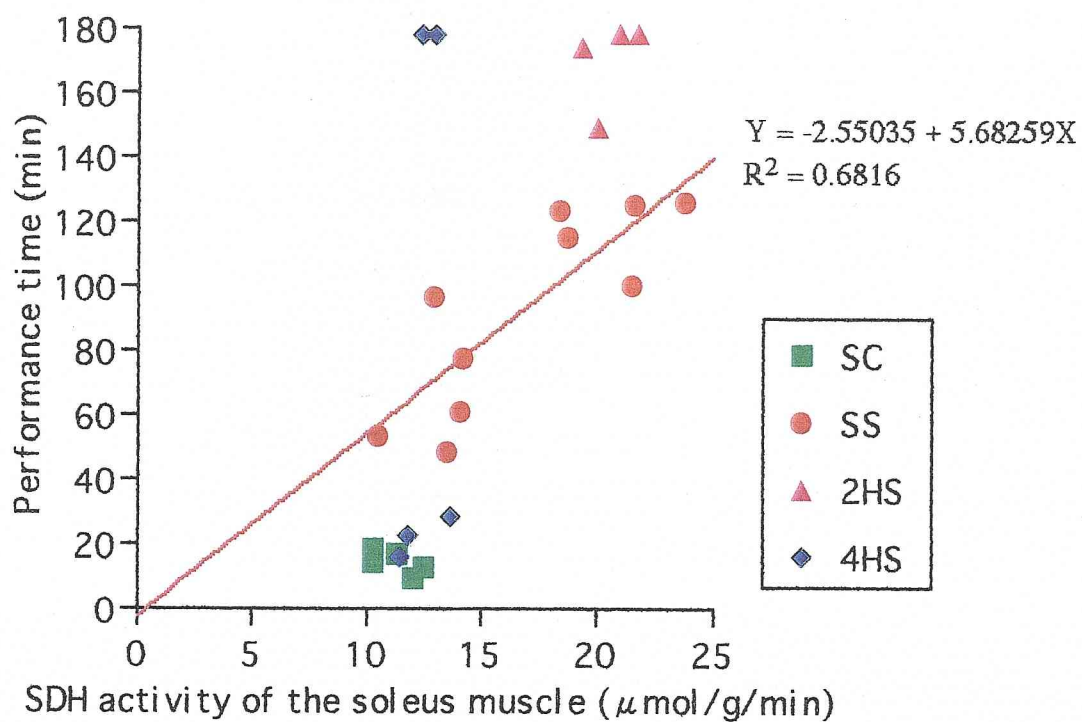


Figure 5-1. Relationship between SDH activity and endurance performance time after 5 wk-swimming training for all rats. SDH, succinate dehydrogenase; EDL, extensor digitorum longus. A strong liner relationship ( $p < 0.005$ ) was observed in SS rats.

れる。

Bigard らは、高度 4,000 m 相当の低圧環境下で 14 週間の長期に亘ってラットに水泳トレーニングを課し、ヒラメ筋では 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素 (HAD) 活性の増加を認めているが、クエン酸合成酵素 (CS) 活性には変化はなく、解糖系のヘキソキナーゼ (HK) 活性の増加をみており、また長指伸筋のミトコンドリア酵素活性には変化がなかったことを報告している [Bigard et al., 1991]。Bigard らや先述した Young らの報告 [Young et al., 1982] と本実験結果から、高度 4,000 m から 5,000 m の範囲では、筋へのエネルギー供給において解糖系代謝への依存を高める方向に移行しているものと推測される。

高度 4,000 m を超える低圧環境下では、Bigard らの実験のように長期の曝露期間を設けても酸化系代謝能の亢進はさほど期待できない。Terblanche らが高度 1,750 m 相当の低圧環境で 2 週間に亘るトレッドミルを用いた走行トレーニングによってラット腓腹筋の CS 活性の増加をみていること [Terblanche et al., 1984] や、本実験における高度 2,200 m 相当の低圧環境下で SDH 活性が増加したことから、高度 2,000 m 前後の中高度の低圧環境下であれば比較的短期間のうちに酸化系代謝能の亢進がみられ、身体パフォーマンスの改善に有益であることが示唆される。

## 第 6 章

### 総合考察 — 環境適応の筋生理学 —

#### 6. 1 骨格筋の低酸素環境適応の特性

##### 1) ヒラメ筋に発現する筋線維タイプの移行

序章に記したとおり、従来の生理学的見解では、一度分化した筋線維タイプを生理的変動の範囲にある運動トレーニングなどの筋への機械的刺激によって後天的に変化させること、とりわけ収縮特性を異にする遅筋線維と速筋線維との間で移行が生ずることは極めて困難であると考えられてきた。しかしながら本論文で示した高度 2,200 m 相当という生理的適応が十分に可能である中高度相当の低酸素環境の下で、比較的短期間のうちにラットのヒラメ筋筋線維タイプに遅筋 (SO) 線維から速筋 (FOG) 線維への移行の生ずることが、組織化学的手法によって明らかにされた。また、筋線維タイプの決定因子たるミオシン重鎖 (MHC) アイソフォームの組成変化の分析において、収縮特性が slow type である MHC I の組成比率の増加が抑制されており、分子レベルにおいても筋線維タイプの移行を裏づけることができた。

低酸素環境下で筋線維のタイプ移行が選択的に生じる可能性を最初に指摘したのは Taguchi らの報告であった [Taguchi et al, 1985]。しかし、Taguchi らの低圧実験に先立つ Sillau と Banchero の報告 [Sillau and Banchero, 1977] や、それ以後におこなわれた Bigard らの高所トレーニングのモデル実験 [Bigard et al, 1991] では、ヒラメ筋を含むラットの骨格筋に遅筋線維と速筋線維間の組成比率に変化を認めていない。

実験結果にこのような相違が生じた原因としては、低圧度の差が考えられる。生体の低圧環境適応は、低圧適応が十全になされることによって常住が可能となる高度範囲 (moderate altitude) と、厳しい低圧環境のため適応が十分に果たされず、全身の衰退が生じて短期間での滞在のみが可能な高度範囲 (extreme

altitude) とに区分される。両者の境界は高度 5,500 m 前後といわれているが [中島, 1987]、それぞれの環境下では骨格筋の代謝様式も異なってくる。moderate altitude では解糖系酵素活性は変化しないか、あるいは抑制される傾向にあるが、酸化系酵素活性は増進する。他方、extreme altitude では解糖系酵素活性は変化しないかまたは増加するが、極端な酸素不足状態のために酸化系酵素活性は著しく低下する [Terrados et al, 1988; Howald et al., 1990]。

第 5 章に記したとおり、高度 4,000~4,300 m におけるトレーニングでは、Young らや Taguchi ら、および Bigard らはいずれもクエン酸回路の律速酵素活性に変化を認めておらず [Young et al., 1982; Taguchi et al, 1985, Bigard et al., 1991]、我々の実験結果も同様であった。これらの結果から、高度 4,000 m から 5,100 m という環境への曝露は、骨格筋の代謝適応が酸化系依存から解糖系依存に移行する臨界にあると考えられる。したがって、エネルギー供給が解糖系に依存するようになると、第 5 章の実験において観察されたように、持久性パフォーマンスの低下する可能性が増大するものと思われる。

Taguchi らがラットのヒラメ筋に筋線維組成の速筋線維化を認めたのは高度 4,000 m 相当の低圧環境下にあり [Taguchi et al, 1985]、他方、ヒラメ筋の筋線維組成に変化を認めなかった Sillau と Banchemo の実験は高度 5,100 m という常住可能な限界高度にほぼ相当する低圧度であり [Sillau and Banchemo, 1977]、Bigard らの実験は高度 4,000 m 相当であった [Bigard et al., 1991]。このような差異がみられたのは、高度 4,000 m 以上の環境では適応性変化の発現に個体差が大きくなるためではないかと推測される。ヒラメ筋ではもとより酸化系代謝経路への依存度が高いため、ヒラメ筋の筋線維に移行が生ずるのは、筋への酸素供給が十分に可能な、中高度に相当する低圧環境下において発現する適応性変化ではないかと考えられる。

## 2) 低酸素刺激に対する筋の特異的反応

第 2 章ならびに第 4 章に記したように、低酸素環境下ではヒラメ筋に筋線維タイプの移行が発現したが、長指伸筋には観察されなかった。また Taguchi らと Bigard らの実験では、長指伸筋に速筋線維のサブタイプ間の組成比率の変化(酸

化系代謝能が高い FOG タイプの増加) がみられたが、遅筋線維と速筋線維の比率は変化しなかった [Taguchi et al, 1985; Bigard et al., 1991]。これらの結果は、低酸素環境下ではあらゆる骨格筋に一樣に同じ変化が現れるものではなく、筋の種類によって反応が異なる特異性を有することを示唆する。

骨格筋は特定の動作の発揮のために分化・発達を遂げた組織であり、その筋に特有の収縮様式をもつ。その収縮様式を発揮・維持するために、収縮エネルギーを供給する代謝能も固有の発達を遂げる。したがって、低酸素刺激に対する反応に上記のような筋特異性が生ずる原因のひとつには、ヒラメ筋と長指伸筋の低酸素状態に対する代謝的な適応機構における感受性の違いがあるためと考えられる。

さらに第2章に記したように、ヒラメ筋は姿勢保持に働く抗重力筋であり、大きな張力発揮を必要としないが、支配神経からの刺激を絶えず受けて持続的な緊張を要求される [Close, 1964]。そのような収縮特性はエネルギー供給系の特性に反映し、酸化系代謝能の高い SO 線維と FOG 線維によってほとんどが構成され、その血管床は安静時・運動時に変わりなく、ほぼ一定の血流量を確保する [Hilton et al., 1970]。しかしながら、ヒラメ筋の血流量が常に一定であるということは、常圧環境下では十分な酸素供給状態にあるが、長指伸筋などの速筋の血管床にみられるように血流量を増減させて酸素供給量を調節する代謝適応を確立していないので、低酸素環境下で酸素供給が不十分になると、逆に筋細胞の構造的変容という新しい適応段階へ移行すると考えられる。すなわち、低酸素環境下のヒラメ筋では血流量に変化がなく、酸素供給量が制限されるため、ヒラメ筋の組織内の酸素利用効率を高めることが重要になり、ミトコンドリア密度が高い FOG 線維に移行するものと考えられる。

他方、長指伸筋の収縮特性は瞬発的な張力発揮を有し、持久性を多く必要としない。このため、FG 線維と FOG 線維で大部分が構成され、解糖系代謝能が高く酸化系代謝への依存度が小さい筋である。したがって、低酸素環境下にあってもヒラメ筋ほど代謝能に直接的な影響を被ることがないと考えられる。加えて、長指伸筋では血管床の発達・退化は代謝程度に応じて変化し、血流量の増加によって酸素供給量を補償する機構が備わっているため、長指伸筋の筋組織に筋線維タ

タイプの移行といった構造的変化が要求されるほどの酸素不足状態が引き起こされるに至ることは少なく、通常の生理的変動範囲の内で対応が可能であると推測できる。

常圧環境下での運動トレーニングで筋線維のタイプ移行が生じにくいのは、ヒラメ筋の場合、運動中も血流量にほとんど変化がないことに根拠があると考えられる。また長指伸筋などの速筋の場合は、体内の血流分布を変化させて、運動時には血管床を拡張させて血流量を増加することで酸素供給量が比較的に確保されるので、筋線維組成に大きな変化が生じないと結論づけられる。

## 6. 2 筋線維に対する低酸素ストレスと甲状腺ホルモン作用との関係

本論文で示した知見および多くの先行報告から、甲状腺ホルモンが低酸素環境下の筋線維の再分化に作用している可能性は極めて高いと判断される。甲状腺ホルモンの機能は多岐にわたるが、筋線維のタイプ移行に関しては、基礎代謝の調節と細胞の成長・分化に作用することである。

低酸素環境下で進行する反応には、基礎代謝量の増加や赤血球数の増加、筋組織における筋横断面積の減少やミトコンドリア量の増加、脂肪蓄積の減少などがある [浅野, 1991; Ward et al, 1995]。これらの反応は、甲状腺ホルモンの亢進時に各組織でみられる反応と共通性がある [Malgor et al., 1975; Winder et al., 1975; 佐久間, 1999]。筋線維の分化に関しては、第4章に記したとおり、甲状腺ホルモン亢進下における各タイプのミオシン重鎖アイソフォーム (MHC isoform) をコードする mRNA の発現量の比率 [Izumo et al., 1986] と、本研究で示された低圧環境下で現れる筋線維タイプの組成比率が対応することは有力な論拠である。また、アドレナリン $\beta$ 受容体作動薬の投与によってヒラメ筋で速筋線維比率の増加が報告されているが [Zeman et al., 1988]、甲状腺ホルモンはアドレナリン作用を増強することが知られており [伊藤と黒島, 1992]、交感神経・副腎髄質系活動を介した筋線維組成への作用も考えられる。

Walters と Constable はラットを用いて 20℃の水に1日1時間浸すた寒冷曝露実験を19週間にわたっておこない、ヒラメ筋筋線維において type I 線維比率

の減少と type II A 線維比率の増加を観察し、長指伸筋には筋線維組成の変化を認めなかったと報告している [Walters and Constable, 1993]。この寒冷曝露後にみられたヒラメ筋と長指伸筋の筋線維組成の変化は、第2章や第4章の低圧曝露実験で観察されたように、ヒラメ筋で SO 線維比率が減少して FOG 線維比率が増加したこと、および長指伸筋の筋線維組成に変化がなかったことと全く同じ結果であった。基礎代謝量の増加を引き起こす環境変化であることに関して、寒冷曝露と低酸素曝露には共通性があり、これら双方の環境下に現れた筋線維組成の変化には同一の機序が作用した可能性が高いと考えられる。Walters と Constable も血中の甲状腺ホルモン濃度を測定し、その増加を確認しており、寒冷曝露下における筋線維のタイプ移行に甲状腺ホルモンが作用することを推測している [Walters and Constable, 1993]。

ただし、甲状腺ホルモンの血清濃度の増減はごく一時的なものであり、甲状腺からのホルモン分泌量の単独要因が筋組織への決定的作用であると結論づけられないが、筋組織における甲状腺ホルモンの受容メカニズムの解明が筋線維タイプ移行のメカニズムを明らかにするものである。骨格筋は甲状腺ホルモンレセプターが多数分布する組織であり [佐久間; 1999]、レセプター数の増加または結合度の増強、あるいはレセプター結合後の情報伝達に増幅や修飾のあることが予測される。

Lee らは、心筋において甲状腺ホルモンレセプターが  $\alpha$  タイプ（心筋にのみみられる）の MHC isoform 遺伝子の発現の活性化に関与することを示している [Lee et al, 1997]。おそらく、低圧刺激の場合も甲状腺ホルモンレセプターの作用を修飾して、筋のミオシン重鎖アイソフォームの発現部位の転写調節がなされ、特定のミオシンタンパク質を合成すると考えられる。また、骨髓細胞を観察した実験ではあるが、ErkenBrack と Clemons は低酸素状態に曝露したラットの骨髓における甲状腺レセプターの結合度が、通常の2～3倍に増強されたことを報告している [ErkenBrack and Clemons, 1988]。

骨格筋の収縮特性は、一義的には支配する運動神経の電気的性質（軸索伝導速度や活動電位、後過分極など）によって規定される [Burke and Edgerton, 1975]。



ラットのヒラメ筋の場合、生後 16 日目には既に 1 本の筋線維を単一の神経が支配する成熟した様式が形成されることが報告されている [Miyata と Yoshioka, 1980]。したがって、単一神経支配が形成された後に低圧環境曝露によって引き起こされる遅筋線維から速筋線維への転換には、その筋線維を支配していた運動神経の電氣的性質に変化が生じることを意味すると考えられる。甲状腺ホルモンが運動単位に及ぼす影響に関しては、Sickles らがヒラメ筋と大腿筋膜張筋およびその支配神経を調べている [Sickles et al., 1987]。その結果、甲状腺ホルモン亢進下において、ヒラメ筋では FOG 線維と INT 線維比率が増加して SO 線維比率が減少し、その支配神経細胞では酸化系酵素活性と解糖系酵素活性の双方が増加することをみつけている。他方、速筋である大腿筋膜張筋には筋線維組成に変化はなく、その支配神経細胞の酵素活性にも変化がなかった。したがって、Sickles ら (1987) は、甲状腺ホルモンが slow type の運動単位に選択的に作用していると結論づけている。また、Haddad らは、ヒラメ筋に除神経処置を施したラットに甲状腺ホルモンを投与すると、MHC I が減少して MHC II A が増加し、また MHC II X の発現量も多くなることを示し、甲状腺ホルモンは支配神経を介さずに筋のミオシン重鎖の発現に直接作用することを明らかにしている [Haddad et al., 1997]。これらの研究結果を総合すると、筋線維タイプの移行には甲状腺ホルモンが筋へ直接作用する効果と、甲状腺ホルモンが支配神経へ作用した後、神経を介して作用する効果との双方が合成されて引き起こされると考えられる。

筋線維の特性は、神経支配の発火パターンのみによって一義的に決定されるのではなく、内分泌系を含めた様々な分子的制御機構によって重層的に調節されているといえる。骨格筋の制御機構が構築される時、生得した神経・筋単位機構に、さらに内分泌系や交感神経系および末梢循環系の調節因子が、複雑であるが整理された系を完成していくと考えられる。

### 6. 3 結語 — 今後の環境適応能研究の方法 —

低圧刺激によって筋線維タイプが移行する分子的な機構については、先行研究

をもとに甲状腺ホルモンとの関連を予想して前節に記したが、環境適応研究にも今後さらに分子生物学的な手法が要求されるものと思われる。

大石らは熱ショックや酸化ストレス、虚血などの細胞に損傷をもたらす様々なストレスに対する細胞の防御機構として合成されるタンパク質として知られるストレスタンパク質のうち、HSP 60 と HSP 72 について、非ストレス下での腓腹筋内の分布を調べ、type I 線維と type II A 線維において特異的に発現し、type II B 線維および type II X 線維にはみられないことを報告している [大石ら, 1998]。ストレスタンパク質の多くは、非ストレス下においても細胞内の正常な代謝の維持やタンパク質の形成と輸送、転写因子の調節、シグナル伝達およびシグナル受容体の活性調節など、広範な細胞機能の制御に関わる分子シャペロンとしての機能のあることが明らかにされている [永田和宏, 1997]。type II B 線維および type II X 線維に比較して、支配神経からの刺激に対して優先的に動員される type I 線維や type II A 線維の方がより高い頻度でストレスに曝されているために、通常時においてもストレスタンパク質の発現がみられると大石らが解するのは、筋線維の特性からみて合理的といえる。したがって、低圧環境下でみられる筋線維タイプの type I (SO) から type II A (FOG) への転換には、ストレスタンパク質がミオシン重鎖分子の発現に介在している可能性も高い。あるいは、ストレスタンパク質が筋細胞内での甲状腺ホルモンのシグナル伝達と関連して作動しているのかもしれない、このような分子生物学の分野からの検討も一層必要となろう。

しかしながら、細胞内の分子レベルでの反応機序が明らかになっても、必ずしもその反応のもつ意味が分明になるとは限らない。細胞内での分子応答が生体全体の適応機構の中でどのように位置づけられ、どのような意味をもつのかということが絶えず検証されなければその機能は明確にならない。このことは、福田淳の以下の言葉とも相通じるものがあるように思われる。「生理学的に面白いのは、むしろ遺伝子レベルである因子がないにもかかわらず、その動物はいかに外界に適応して生存してきたかというところにある。我々生理学者にとっての関心事は、生体が単なる部品の寄せ集めでなく、一つの寿命を全うすべく、内的・外的障害

因子にもかかわらず、生存する術をどのように身に付けているかを知ることである。生命体のもつ不思議さ、生きることの素晴らしさ、そういうものをよりよく知るところにある」〔福田, 1996〕。一例として、近年発達した遺伝子ノックアウト技術によって、筋細胞内で酸素分子の捕捉・運搬に働くミオグロビンをもたないマウスを作製した Garry らは、ミオグロビン欠損マウスの運動能力が正常マウスのものと差がないことを報告している〔Garry et al., 1998〕。この研究結果はミオグロビン機能の再検討を促すものであるが、それ以上にミオグロビン欠損に対して筋組織ではどのような代償機構が存在するのかについて重要な問題提起をしていると思われる。

生体の構造と機能から「生きること」の意味を知ろうとする生理学にとって、生命現象には上記の例のように、単純な化学反応のような 1 対 1 の対応には収まりきらない複雑性があるため、研究の方法上の困難さが常にともなう。菅弘之は今後の生理学とその方法に関して、「（システム生理学は）有機的にあるがままの系、臓器、組織、細胞などをダイナミックシステムとして捉え、そこに益々累積してくる要素還元的生理学知識を有効に統合利用して、マクロ・ミクロ連関を解明していく学問である。そのためには、自分が興味を持つ研究対象システムを選ぶこと以外に、実験、計測、データ処理、その解釈等、様々な問題の解決が必要である」と述べている〔菅, 1997〕。

適応現象は細胞レベルから個体にまで普遍的に存在すると考えられている。したがって、ミクロからマクロまでを見通した生体全体に生起する現象の意味を理解する上で、「適応」は重要な生理的概念である。本論文で研究対象とした骨格筋は、とりわけ構造と機能が密接に結びついた組織であり、筋に働く適応機構のもつ「意味」は、他の器官や組織に比較して理解しやすい利点がある。本研究においても、筋線維やミオシン分子の組成変化の意味を理解するにあたっては、その筋の収縮や代謝の特性に鑑みることが可能であった。

菅が指摘するとおり、生命現象の研究方法には解決すべき問題が数多くあるが、これに関して、デュボス (Dubos, R.) が、「パブロフ、フロイド、フリッシュ、それにローレンツによって、人間と動物がいろいろの状況に対して示す応答につ

いての科学的な分析の戸が開かれた。それは、新しい技術を導入したことによるというよりも、生体、つまり生きている実体として機能している時でなければ研究できないような生命の様相が多数存在していることを容認したことによるのである。彼らが利用した技術は、それよりもずっと以前にも発展させることができたようなものであった。（中略）同様に、身体の機械的からくりの機能を支えている単位となる構造と反応についての知識がさらに進展するのを待たなくても、生命の過程をその現われの一切の複雑さにおいて研究するための技術は、現在でも開発できるであろう」と述べているのは貴重な示唆といえる〔デュボス・木原訳, 1982〕。

筋の環境適応能研究は、適応という生命現象の重要な仕組みに関わる研究テーマのひとつであるとともに、生体に生起する複雑な生命現象の意味を理解する上で、筋に現れる「一切の複雑さ」を研究するための技術が新たに開発される可能性に最も富んだ分野ではないかと思われる。

## 参考文献

- Armstrong, R.B. and Phelps, R.O. : Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171 : 259-272, 1984.
- 朝比奈一男 : 低酸素耐性と運動能力. *日本生理学雑誌* 34 : 405-417, 1972.
- 浅野勝己 : 高地トレーニングの基礎—その生理学的効果について—. *臨床スポーツ医学* 8 : 585-592, 1991.
- 浅野勝己 : 高所トレーニングと持久力. *持久力の科学* (石河利寛, 竹宮隆 編), 杏林書院, pp. 192-233, 1994.
- Bagby, G.J., Sembrowich, W.L. and Gollnick, P.D. : Myosin ATPase and fiber composition from trained and untrained rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 223 : 1415-1417, 1972.
- Bar, A. and Pette, D. : Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 235 : 153-155, 1988.
- Barany, M. : ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* 50 : 197-218, 1967.
- Barany, M. and Close, R.I. : The transformation of myosin in cross-innervated rat muscles. *J. Physiol.* 213 : 455-474, 1971.
- Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Furukawa, T. and Peter, J.B. : Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* 220 : 410-414, 1971.
- Bell, G.J., Martin, T.P., Ilyina-Kakueva, E.I., Oganov, V.S. and Edgerton, V.R. : Altered distribution of mitochondria in rat soleus muscle fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 73 : 493-497, 1992.
- ベルナル, C. (三浦岱栄・訳) : 実験医学序説. 岩波書店, 1970.
- Bigard, A.X., Brunet, A., Guezennec, C.Y. and Monod, H. : Skeletal muscle changes after endurance training at high altitude. *J. Appl. Physiol.* 71 : 2114-2121, 1991.
- Boyer, S.J. and Blume, F.D. : Weight loss and changes in body composition at high altitude. *J. Appl. Physiol.* 57 : 1580-1585, 1988.
- Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. : Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18 : 670-672, 1970a.
- Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. : Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23 : 369-379, 1970b.
- Buller, A.J., Eccles, J.C. and Eccles, R.M. : Interaction between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J.*

- Physiol. 150 : 417-439, 1960.
- Buller, A.J. and Lewis, D.M. : The rate of tension development in isometric tetanic contractions of mammalian fast and slow skeletal muscle. J. Physiol. 176 : 337-354, 1965.
- Buller, A.J., Mommaerts, W.F.H.M. and Seraydarian, K. : Enzymic properties of myosin in fast and slow twitch muscles of the cat following cross-innervation. J. Physiol. 205 : 581-597, 1969.
- Burke, R.E. : Motor unit types of cat triceps surae muscle. J. Physiol. 193 : 141-160, 1967.
- Burke, R.E. : Anatomy and innervation ratios in motor units of cat gastrocnemius. J. Physiol. 234 : 749-765, 1973.
- Burke, R.E. and Edgerton, V.R. : Motor unit properties and selective involvement in movement. Exerc. Sport Sci. Rev. 3 : 31-81, 1975.
- Caiozzo, V.J. and Haddad, F. : Thyroid hormone: modulation of muscle structure, function, and adaptive responses to mechanical loading. Exerc. Sports Sci. Rev. 24 : 321-361, 1996.
- Caiozzo, V.J., Haddad, F., Baker, M.J., Herrick, R.E., Prietto, N. and Baldwin, K.M. : Microgravity-induced transformations of myosin isoforms and contractile properties of skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 81 : 123-132, 1996.
- キャノン, W.B. (館鄰, 館澄江・訳) : からだの知恵 - この不思議なはたらき - 講談社, 1981.
- Close, R. : Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. J. Physiol. 173 : 74-95, 1964.
- Corley, C., Kowalchuk, N. and McComas, A.J. : Contrasting effects of suspension on hindlimb muscles in the hamster. Exp. Neurol. 85 : 30-40, 1984.
- Costill, D.L., Coyle, E.F., Fink, W.F., Lesmes, G.R. and Witzmann, F.A. : Adaptations in skeletal muscle following strength training. J. Appl. Physiol. 46 : 96-99, 1979.
- Crowell, J.W., Ford, R.G. and Lewis, V.M. : Oxygen transport in hemorrhagic shock as a function of the hematocrit ratio. Am. J. Physiol. 196 : 1033-1038, 1959.
- Desplanches, D., Mayet, M.H., Ilyina-Kakueva, E.I., Senpore, S. and Flandrois, R. : Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. J. Appl. Physiol. 68 : 48-52, 1990.
- Desplanches, D., Mayet, M.H., Senpore, S. and Flandrois, R. : Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. J.

- Appl. Physiol. 63 : 558-563, 1987.
- Devor, S.T. and White, T.P. : Myosin heavy chain phenotype in regenerating skeletal muscle is affected by thyroid hormone. *Med. Sci. Sports Exercise* 27 : 674-681, 1995.
- ドストエフスキー, F.M. (江川卓・訳) : ニコライ・ニコラーエヴィチ・ストラーホフ宛書簡 (1869年2月26日). 決定版ドストエフスキー全集 22, 新潮社, pp. 69-80, 1980.
- デュボス, R. (田多井吉之介・訳) : 健康という幻想 - 医学の生物学的変化 -. 紀伊國屋書店, pp. 25-48, 1977.
- デュボス, R. (木原弘二・訳) : 人間と適応 - 生物学と医療 - (第2版). みすず書房, pp. 263-273, 1982.
- ErkenBrack, D.E. and Clemons, G.K. : Modulation of thyroid hormone receptors by non-thyroidal stimuli. *J. Recept. Res.* 8 : 839-852, 1988.
- Fitzsimons, D.P., Herrick, R.E. and Baldwin, K.M. : Isomyosin distributions in rodent muscles: effects of altered thyroid state. *J. Appl. Physiol.* 69 : 321-327, 1990.
- Fregosi, R.F. and Dempsey, J.A. : Arterial blood acid-base regulation during exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 57 : 396-402, 1984.
- 福田淳 : 分子生物学と生理学. *日本生理学雑誌* 58 : 101-102, 1996.
- Galton, V.A. : Some effects of altitude on thyroid function. *Endocrinology* 91 : 1393-1403, 1972.
- Garry, D.J., Ordway, G.A., Lorenz, J.N., Radford, N.B., Chin, E.R., Grange, R.W., Bassel-Duby, R. and Williams, R.S. : Mice without myoglobin. *Nature* 395 : 905-908, 1998.
- Gollnick, P.D., Armstrong, R.B., Saltin, B., Saubert IV, C.W., Sembrowich, W.L. and Shepherd, R.E. : Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 34 : 107-111, 1973.
- Gollnick, P.D., Armstrong, R.B., Saubert IV, C.W., Piehl, K. and Saltin, B. : Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* 33 : 312-319, 1972.
- Gollnick P.D., Parsons, D. and Oakley, C.R. : Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. *Histochemistry* 77 : 543-555, 1983.
- Green, H.J., Klug, G.A., Reichmann, H., Seedorf, U., Wiehrer, W. and Pette, D. : Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflugers Arch.* 400 : 432-438, 1984.

- Green, H.J., Sutton, J.R., Wolfel, E.E., Reeves, J.T., Butterfield, G.E. and Brooks, G.A.: Altitude acclimatization and energy metabolic adaptations in skeletal muscle during exercise. *J. Appl. Physiol.* 73 : 2701-2708, 1992.
- Haddad, F., Arnold, C., Zeng, M. and Baldwin, K.: Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve* 20 : 1487-1496, 1997.
- Harris, J.A., Jackson, D.G., Paterson, D.G. and Scammon, R.E.: The measurement of man. The Univ. Minnesota press, pp. 173-215, 1930.
- 早川信彦, 平川秀三, 長宅芳男, 川崎秀孝, 谷本千佳子, 三村由香里, 太田善介: 低アルブミン血症患者および慢性血液透析患者における血中遊離甲状腺ホルモンの新しい測定キットの検討. *ホルモンと臨床* 42 : 1001-1007, 1994.
- 林康之, 玄番昭夫: 正常値ガイドブック その臨床応用. 宇宙堂八木書店, pp. 256-258, 1986.
- Hildebrand, I.L., Sylven, C., Esbjornsson, M., Hellstrom, K. and Jansson, E.: Does chronic hypoxaemia induce transformations of fibre types? *Acta Physiol. Scand.* 141 : 435-439, 1991.
- Hilton, S.M., Jeffries, M.G. and Vrbova, G.: Functional specialization of the vascular bed of the soleus muscle. *J. Physiol.* 206 : 543-562, 1970.
- Holloszy, J.O.: Biochemical adaptations in muscle: effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242 : 2278-2282, 1967.
- Holy, X. and Mounier, Y.: Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscle. *Muscle Nerve* 14 : 70-78, 1991.
- Howald, H., Pette, D., Simoneau, J.-A., Uber, A., Hoppeler, H. and Cerretelli, P.: Effects of chronic hypoxia on muscle enzyme activities. *Int. J. Sports Med.* 11 : S10-S14, 1990.
- Ianuzzo, D., Patel, P., Chen, V., O'Brien, P. and Williams, C.: Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature* 270 : 74-76, 1977.
- 伊藤眞次, 黒島晨汎: 最新人体生理学入門. 朝倉書店, pp. 105-135, 1992.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V.: All members of MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231 : 597-600, 1986.
- Jansson, E., Esbjornsson, M., Holm, I. and Jacobs, I.: Increase in the proportion of fast-twitch muscle fibres by sprint training in males. *Acta Physiol. Scand.* 140 : 359-363, 1990.
- 『人環フォーラム』編集委員会: 『人環フォーラム』の趣旨. 人環フォーラム 4, 京都大学大学院人間・環境学研究科, 1998.
- 河辺典子: クレアチンキナーゼ (CK), CK アイソザイム. スポーツと臨床検査



- (臨床スポーツ医学編集委員会 編), 臨床スポーツ医学 14, 臨時増刊号, 文光堂, pp. 45-47, 1997a.
- 河辺典子 : 乳酸脱水素酵素 (LDH), LDH アイソザイム. スポーツと臨床検査 (臨床スポーツ医学編集委員会 編), 臨床スポーツ医学 14, 臨時増刊号, 文光堂, pp. 48-50, 1997b.
- 北村元仕 : 乳酸脱水素酵素. 実践臨床化学 1 : 394-401, 1982.
- Komi, P.V., Viitasalo, J.H.T., Havu, M., Thorstensson, A., Sjodin, B. and Karlsson, J. : Skeletal muscle fibers and muscle enzyme activities in monozygous and dizygous twins of both sexes. *Acta Physiol. Scand.* 100 : 385-392, 1977.
- Krotkiewski, M., Kral, J.G. and Karlsson, J. : Effects of castration and testosterone substitution on body composition and muscle metabolism in rats. *Acta Physiol. Scand.* 109 : 233-237, 1980.
- 黒島晨汎 : 環境生理学 (第2版). 理工学社, pp. 9-113, 1993.
- Lee, Y., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. and Izumo, S. : Myocyto-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the  $\alpha$ -cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 2745-2755, 1997.
- Levine, B.D. and Stray-Gundersen, J. : "Living high-training low" : effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *J. Appl. Physiol.* 83 : 102-112, 1997.
- Li, X. and Larsson, L. : Contractility and myosin isoform compositions of skeletal muscles and muscle cells from rats treated with thyroid hormone for 0, 4, 8 weeks. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18 : 335-344, 1997.
- Lowey, S., Waller, G.S. and Trybus, K.M. : Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speed of shortening. *Nature* 365 : 454-456, 1993.
- Mabuchi, K. and Sreter, F.A. : Actomyosin ATPase II fiber typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle and Nerve* 3 : 233-239, 1980.
- 前多敬一郎 : ストレスという概念とその広がり. ストレスとホルモン (日本比較内分泌学会 編), 学会出版センター, pp. 1-10, 1997.
- Mahdavi, V., Strehler, E.E., Periasamy, M., Wieczorek, D.F., Izumo, S. and Nadal-Ginard, B. : Sarcomeric myosin heavy chain gene family: organization and pattern of expression. *Med. Sci. Sports Exerc.* 18 : 299-308, 1986.
- Malgor, L.A., Blanc, C.C., Klainer, E., Irizar, S.E., Torales, P.R. and Barrios, L. : Direct effects of thyroid hormones on bone marrow erythroid cells of rats. *Blood* 45 : 671-679, 1975.

- Martin, T.P., Vailas, A.C., Durivage, J.B., Edgerton, V.R. and Castleman, K.R. : Quantitative histochemical determination of muscle enzymes: biochemical verification. *J. Histochem. Cytochem.* 33 : 1053-1059, 1985.
- Matoba, H., Allen, J.R., Bayly, W.M., Oakley, C.R. and Gollnick, P.D. : Comparison of fiber types in skeletal muscles from ten animal species based on sensitivity of the myofibrillar actomyosin ATPase to acid or copper. *Histochemistry* 82 : 175-183, 1985.
- 的場秀樹, 森田俊介, 杉浦崇夫 : 骨格筋の筋線維タイプと適応性変化. *日本運動生理学雑誌* 2 : 127-142, 1995.
- Mendell, L.M., Munson, J.B. and Scott, J.G. : Alterations of synapses on axotomised motoneurons. *J. Physiol.* 255 : 67-79, 1976.
- 光田篤司, 浄慶幸江, 迫田裕之, 二宮伊都子, 村上由紀子, 中村勲, 今西孝充, 高見寿夫, 近藤信一, 巽英二, 山口延男 : 血液日常検査への NE-7000 の導入とその評価. *Sysmex Journal* 13 : 82-95, 1990.
- Miyata, Y. and Yoshioka, K. : Selective elimination of motor nerveterminals in the rat soleus muscle during development. *J. Physiol.* 309 : 631-646, 1980.
- Moore, L.G., McMurtry, I.F. and Reeves, J.T. : Effects of sex hormones on cardiovascular and hematologic responses to chronic hypoxia in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158 : 658-662, 1978.
- 森井秀樹, 山崎先也, 岡本啓, 石原昭彦, 田口貞善 : 変動低圧環境下での飼育およびトレーニングがラット骨格筋の組織化学的・生化学的特性に与える影響. *登山医学* 12 : 91-96, 1992.
- Nachlas, M.M., Tsou, K.C., Souza, E.D., Cheng, C.S. and Seligman, A.M. : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* 5 : 420-436, 1957.
- 永田和宏 : シャペロン機能の多様性. *細胞工学* 16 : 1328-1242, 1997.
- 中島道郎 : ヒマラヤ登山と高所順応. *Jpn. J. Sports. Sci.* 6 : 114-118, 1987.
- 襦屋光男, 川原貴 : 長距離選手における血液性状の特徴. *体力科学* 46 : 870, 1997.
- Nicol, C.J.M. and Bruce, D.S. : Effect of hyperthyroidism on the contractile and histochemical properties of fast and slow twitch skeletal muscle in the rat. *Pflugers Arch.* 390 : 73-79, 1981.
- 日本生理学会 : 生理学領域における動物実験に関する基本的指針. *日本生理学雑誌* 50 : 206-207, 1988.
- 小川政恭・訳 : ヒポクラテス 古い医術について他八篇. 岩波書店, 1963.
- 大石康晴, 石原昭彦, 井福裕俊, 谷口紘八, 松元尚大 : ラット骨格筋線維におけるストレス蛋白質の特異的発現. *体力科学* 47 : 87-92, 1998.

- 岡田理美, 埜中征哉, 石浦章一, 杉田秀夫 : ラット筋線維の発育・分化に関する組織化学的研究. 神経内科 15 : 363-370, 1981.
- 岡本啓, 山崎先也, 小河繁彦, 千家弘行, 飯田治三, 福田俊, 田口貞善 : 重粒子線照射が月齢の異なるラット骨格筋の形態的・組織化学的特性に及ぼす影響. 宇宙生物科学 10 : 230-231, 1996.
- Ou, L.C., Sardella, G.L., Leiter, J.C., Brinck-Johnsen, T. and Smith, R.P. : Role of sex hormones in development of chronic mountain sickness in rats. J. Appl. Physiol. 77 : 427-433, 1994.
- Ou, L.C. and Smith, R.P. : Strain and sex differences in the cardiopulmonary adaptation of rats to high altitude. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 177 : 308-311, 1984.
- Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A. and Stempel, K.E. : Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry 11 : 2627-2633, 1972.
- Pette, D., Smith, M.F., Staudte, H.W. and Vrbova, G. : Effects of long-term electrical stimulation on some contractile and metabolic characteristics of fast rabbit muscle. Pflugers Arch. 338 : 257-272, 1973.
- Polla, B., Bottinelli, R., Sandoli, D., Sardi, C. and Reggiani, C. : Cortisone-induced changes in myosin heavy chain distribution in respiratory and hindlimb muscles. Acta Physiol. Scand. 151 : 353-361, 1994.
- Poole, D.C. and Mathieu-Costello, O. : Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles. Microcirculation 3 : 175-186, 1996.
- Ranvier, L. : Dequelques faits relatifs a l'histologie et a la physiologie des muscles stries. Arch. Physiol. Norm. Pathol. 1 : 5-18, 1874.
- 酒井秋男 : 高所環境下にみられる右心室肥大の解明—ヘマトクリットと右心室肥大の関係 (そのⅡ) —. 日本生理学雑誌 39 : 479-489, 1977.
- 酒井秋男, 小林俊夫 : 高地順応の生理的メカニズム. Jpn. J. Sports Sci. 6 : 94-105, 1987.
- 佐久間康夫 : 内分泌生理学講義. 丸善, pp. 35-54, 1999.
- Salmons, S. and Sreter, F.A. : Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. Nature 263 : 30-34, 1976.
- 佐藤方彦 : 気圧環境. 生理人類学入門—人間の環境への適応能—(菊池安行, 坂本弘, 佐藤方彦, 田中正敏, 吉田敬一 共著), 南江堂, pp. 177-225, 1981.
- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K. and Lomo, T. : Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. J. Muscle Res. Cell Motili. 10 : 197-205, 1989.
- セリエ, H. (杉靖三郎, 田多井吉之介, 藤井尚治, 竹宮隆・訳) : 現代社会とストレ

- ス (原書改訂版). 法政大学出版局, 1988.
- Shepherd, R.E., Sembrowich, W.L., Green, H.E. and Gollnick, P.D. : Effect of physical training on control mechanisms of lipolysis in rat fat cell ghosts. *J. Appl. Physiol.* 42 : 884-888, 1977.
- 島岡清 : 高所登山法の変遷. *Jpn. J. Sports Sci.* 10 : 96-100, 1991.
- Sickles, D.W., Oblak, T.G. and Scholer, J. : Hyperthyroidism selectively increases oxidative metabolism of slow-oxidative motor units. *Exp. Neurol.* 97 : 90-105, 1987.
- Sillau, A.H. and Banchero, N. : Effects of hypoxia on capillary density and fiber composition in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 370 : 227-232, 1977.
- Staron, R.S. and Pette, D. : Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry* 86 : 19-23, 1986.
- 菅弘之 : 夢の尽きないシステム生理学. *日本生理学雑誌* 59 : 463-464, 1997.
- 鈴木光雄 : 運動に対する内分泌系の役割. *体育の科学* 42 : 156-162, 1992.
- 多田富雄 : 生命の意味論. 新潮社, pp. 9-56, 1997.
- Taguchi, S., Hata, Y. and Itoh, K. : Enzymatic responses and adaptations to swimming training and hypobaric hypoxia in postnatal rats. *Jpn. J. Physiol.* 35 : 1023-1032, 1985.
- 田口貞善, 小河繁彦, 山崎先也, 岡本啓, 家森幸男, 福田俊, 土倉寛, 飯田治三 : 体懸垂が SHR ラット骨格筋の組織化学的特性に及ぼす影響. *Proceedings of The Eleventh Space Utilization Symposium*, pp. 80-83, 1994.
- 竹本泰一郎 : 高度順応. 環境—その生物学的評価— (鈴木継美, 大塚柳太郎 編), 篠原出版, 東京, pp. 167-186, 1980.
- 田中美智子, 小林敏生, 大平充宣, 本田良行 : 鉄欠乏又は低圧曝露が血液性状及び骨格筋の酵素活性に及ぼす影響. *登山医学* 17 : 83-88, 1997.
- Tanaka, M., Mizuta, K., Koba, F., Ohira, Y., Kobayashi, T. and Honda, Y. : Effects of exposure to hypobaric-hypoxia on body weight muscular and hematological characteristics, and work performance in rats. *Jpn. J. Physiol.* 47 : 51-57, 1997.
- Terblanche, S.E., Groenewald, J.V., van Der Linde, A., Wolfswinkel, J.M., Jooste, P.L. and Oelofsen, W. : A comparative study on the effect of training at altitude and at sea level on endurance and certain biochemical variables. *Comp. Biochem. Physiol.* 78 A : 21-26, 1984.
- Terrados, N., Melichna, J., Sylven, C., Jansson, E. and Kaijser, L. : Effects of training at simulated altitude on performance and muscle metabolic capacity in competitive road cyclists. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57 : 203-209,

1988.

- Tuffery, A.R. : Growth and degeneration of motor end-plates in normal cat limb muscles. *J. Anat.* 110 : 221-247, 1971.
- 宇宙開発事業団・編 : 宇宙医学・生理学. 社会保険出版社, 1998.
- van Handel, E. : Estimation of glycogen in small amount of tissue. *Anal. Biochem.* 11 : 256-265, 1965.
- Vaughan, H.S., Aziz-Ullah, Goldspink, G. and Nowell, N.W. : Sex and stock differences in the histochemical myofibrillar adenosine triphosphatase reaction in the soleus muscle of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 22 : 155-159, 1974.
- 和田正信, 勝田茂 : 骨格筋におけるミオシンアイソフォームの分布—その種類, 収縮特性との関連およびトレーニングによる変化—. *体力科学* 44 : 483-501, 1995.
- Walters, T.J. and Constable, S.H. : Intermittent cold exposure causes a muscle-specific shift in the fiber type composition in rats. *J. Appl. Physiol.* 75 : 264-267, 1993.
- ウオード, M. (御手洗玄洋, 中島寛 訳) : 高所医学. 山と溪谷社, pp. 66-72, 1976.
- Ward, M.P., Milledge, J.S. and West, J.B. : High altitude medicine and physiology, Second edition. Arnold, London, pp. 197-216, 1995.
- 渡部肇, 武部和夫 : 環境変化とホルモン. *からだの科学* 163 : 80-83, 1992.
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. : Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171 : 964-967, 1953.
- Wattenberg, L.W. and Leong, J.L. : Effects of coenzyme Q<sub>10</sub> and menadione on succinic dehydrogenase activity as measured by tetrazolium salt reduction. *J. Histochem. Cytochem.* 8 : 296-303, 1960.
- Winder, W.W., Baldwin, K.M., Terjung, R.L. and Holloszy, J.O. : Effects of thyroid hormone administration on skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol.* 228 : 1341-1345, 1975.
- 山地啓司 : 最大酸素摂取量の科学. 杏林書院, pp. 146-168, 1992.
- 横山直方, 長瀧重信 : 甲状腺ホルモン. (臨床スポーツ医学編集委員会 編) スポーツと臨床検査, *臨床スポーツ医学* 14, 臨時増刊号, 文光堂, pp. 121-125, 1997.
- Yoshino, M., Kato, K., Murakami, K., Katsumata, Y., Tanaka, M. and Mori, S. : Shift of anaerobic to aerobic metabolism in the rats acclimatized to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 97 : 341-344, 1990.
- Young, A.J., Evans, W.J., Cymerman, A., Pandolf, K.B., Knapik, J.J. and Maher, J.T. : Sparing effect of chronic high-altitude exposure on muscle

- glycogen utilization. *J. Appl. Physiol.* 52 : 857-862, 1982.
- Young, A.J., Evans, W.J., Fisher, E.C., Sharp, R.L., Costill, D.L. and Maher, J.T. : Skeletal muscle metabolism of sea level natives following short-term high-altitude residence. *Eur. J. Appl. Physiol.* 52 : 463-466, 1984.
- 万木良平 : 環境適応の生理衛生学. 朝倉書店, pp. 73-106, 1987.
- 柚山芳久, 田頭坦 : Ab ビーズ TSH キット '栄研' の基礎的・臨床的検討. *医学と薬学* 28 : 1031-1036, 1992.
- Zeman, R.J., Ludemann, R., Easton, T.G. and Etlinger, J.D. : Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a  $\beta_2$ -receptor agonist. *Am. J. Physiol.* 254 : E726-E732, 1988.
- Zhou, M.-Y., Klitgaard, H., Saltin, B., Roy, R.R., Edgerton, V.R. and Gollnick, P.D. : Myosin heavy chain isoforms of human muscle after short-term spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 78 : 1740-1744, 1995.

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究の企画から論文の校閲に至るまで、厳格かつ懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました、京都大学大学院人間・環境学研究科教授 田口貞善先生に衷心より御礼申し上げます。

顧みますと、田口先生の環境適応論講義における「運動中は生体にとって一種の低酸素状態とみなせるが、持久性トレーニングでは筋線維タイプは変化しないにもかかわらず、低圧環境への曝露で筋線維タイプに変化が生じるのはなぜか」という問題提起に始まり、以後、骨格筋の低酸素適応の研究に取り組むこととなりました。この問題の解決にはいまだ十分には至っておりませんが、様々な生理学領域に関わる複雑かつ興味深いテーマに遭遇できましたことは、私の研究に方向を与え、充実させました。茲に深甚なる感謝を呈します。

また、田口教授研究室内の大学院生諸氏には、多大の協力と貴重な示唆を戴きましたことに御礼申し上げます。特に、長らく共に実験を推進し、論議を尽くしてくださいました 山崎先也氏に深謝致します。

最後に、田口教授の共同研究者として、本研究の基盤を築かれました 故秦優子先生に謹んで感謝の意を表します。

平成11年 12月 3日

## 付 録

### 関連論文（４編）

- 1 常圧から低圧環境、またその逆の環境への適応能の雌雄差  
1995年12月発行  
登山医学第15巻97－104頁に掲載
- 2 低圧環境下における持久的トレーニングに対する骨格筋の酵素化学的適応  
1996年12月発行  
登山医学第16巻65－72頁に掲載
- 3 低酸素曝露と持久性トレーニングが骨格筋線維と脊髄運動ニューロンの  
酸化系酵素活性に及ぼす影響  
1993年4月発行  
体力科学第42巻第2号122－129頁に掲載
- 4 中高度の低圧環境が筋線維組成および血清甲状腺ホルモンに及ぼす影響  
1998年12月発行  
登山医学第18巻53－59頁に掲載



低酸素暴露と持久性トレーニングが骨格筋線維と脊髄運動  
ニューロンの酸化系酵素活性に及ぼす影響

森 井 秀 樹\* 山 崎 先 也\*\* 岡 本 啓\*  
石 原 昭 彦\*\* 田 口 貞 善\*

EFFECTS OF HYPOXIC EXPOSURE AND ENDURANCE  
EXERCISE TRAINING ON THE OXIDATIVE  
POTENTIALS OF SOLEUS MUSCLE FIBERS  
AND MOTONEURONS IN THE RAT

HIDEKI MORII, SAKIYA YAMASAKI, HIROSHI OKAMOTO,  
AKIHIKO ISHIHARA and SADAYOSHI TAGUCHI

Abstract

Thirty (n=30) seven week old male Sprague-Dawley rats were divided into six groups of five rats (n=5) in each group. The groups were designated Sc=sea level controls; St=sea level trained; Fc=hypoxic exposed (16% O<sub>2</sub>) controls; Ft=hypoxic exposed (16% O<sub>2</sub>) trained; Pc=intermittent hypoxic exposed (18%, 16%, 14%, 16%, 18% O<sub>2</sub> for two days each) controls; and Pt=intermittent hypoxic exercise trained. Exercise training consisted of 45 min/day running on a rat treadmill for 24 consecutive days. Fiber type distribution, succinate dehydrogenase (SDH) activity and glycogen content of the soleus muscle and the oxidative enzyme activity of the motoneurons of the soleus were measured in each group after the 24 days of hypoxic exposure and exercise training. In comparison to each training group's control the glycogen concentration of the soleus muscle was increased ( $P<0.05$ ) regardless of hypoxic exposure. Only the intermittently hypoxic exercise trained group (Pt) demonstrated a fiber type shift of slow-twitch oxidative to fast-twitch oxidative glycolytic fibers. Neither hypoxia or exercise training altered the oxidative enzyme capacity of the soleus motoneurons.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med, 1993, 42: 122~129)

**key words** : Hypoxic environment, endurance training, muscle fiber, spinal motoneuron, histochemistry, rat

1. 緒 言

長期間におよぶ低圧環境への暴露は、慢性的な適応（活動毛細血管数の増加、心臓の肥大、赤血球の造血亢進、呼吸数・心拍数の減少）を引き起こし、高所順化という状態を導く。浅野<sup>2,3)</sup>は、高所での効率的な適応について検討しており、低圧性低酸素環境下で持久的なトレーニングを加えることにより低圧とトレーニングの相乗効果が期待

でき、比較的短期間に順応が獲得できることを報告している。実際に、低圧環境下でのトレーニングは、平地での有酸素運動能力の向上に貢献することから、持久的能力を必要とする競技（陸上の長距離・マラソン、水泳）でのトレーニングとして古くから取入れられてきた<sup>1,5,6,10,20,37)</sup>。しかしながら、低圧環境下でのトレーニングや適応実験は、そのほとんどが急激に高地に一定して滞在する方法を用いるため、体調不順により高所に適応

\*京都大学大学院人間・環境学研究科 Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto  
〒606-01 京都市左京区吉田二本松町 University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan  
\*\*京都大学総合人間学部 Faculty of Integrated Human Studies, Kyoto University, Sakyo-ku,  
〒606-01 京都市左京区吉田二本松町 Kyoto 606-01, Japan

できず、記録を低下させる選手が出ることも報告されている<sup>16,28)</sup>。低圧トレーニングの本質は、低圧適応を達成することによって平常圧環境の記録以上の効果を導き出すことである。田口たち<sup>31)</sup>は、低圧適応による骨格筋の組織化学的变化について長期低圧環境下においてラットに間欠的な水泳トレーニングを負荷した場合、ヒラメ筋において FOG 線維の増加が生じることを認めた。さらに、伊藤たち<sup>13)</sup>は、低圧環境下でラットを飼育した結果、平均直径が 25~45  $\mu\text{m}$  の脊髄運動ニューロンで酸化系酵素活性が高まることを示し、同時にヒラメ筋で SO 線維から FOG 線維へのタイプ移行が生じることを確認した。しかしながら、これらの実験は、前述した長期間におよぶ一定低圧環境下での変化を検討したものであり、生体に対するストレスを考えた場合、必ずしも効率的な適応を示すものではないように思われる。

そこで本研究では、反復的に・規則的に酸素分圧を変化させる環境を設定し、さらに持久的トレーニングを負荷した場合、ヒラメ筋の筋線維タイプ、SDH 活性、グリコーゲン濃度および脊髄運動ニューロンの酸化系酵素活性にどのような影響をおよぼすかを検討した。

## II. 方 法

### A. 実験動物

7 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット 30 匹を、大気圧下での飼育非運動群 (Sc)，大気圧下での運動群 (St)，固定低酸素での非運動群 (Fc)，固定低酸素での運動群 (Ft)，変動低酸素での非運動群 (Pc) および変動低酸素での運動群 (Pt) の 6 群に 5 匹ずつ分けた。

### B. 低酸素環境

運動時以外の飼育は、各群とも大気圧下で行い、固定低酸素運動群には、運動時のみ窒素でバランスをとった酸素濃度 16% の混合ガスを一定して吸気させ、変動低酸素運動群には吸気酸素濃度 ( $F_{\text{IO}_2}$ ) を 18%-16%-14%-16%-18%……と 2 日毎に変化させた混合ガスを吸気させた (Fig. 1)。運動は、研究室で独自に開発したモーター式連続負荷運動器 (Fig. 2) を用いて、毎分 15.3 m の速度で 1 日に 45 分、24 日間連続して負荷した。また、固定低酸素および変動低酸素の非運動群には、運動群と同様に 1 日 45 分間の低酸素暴露を実施した。飼育ならびに運動は  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  の環境で行い、食餌 (固型飼料) と水は自由摂取とした。

### C. 脊髄・ヒラメ筋の摘出

24 日目の運動期間終了後、各群ともエーテル麻

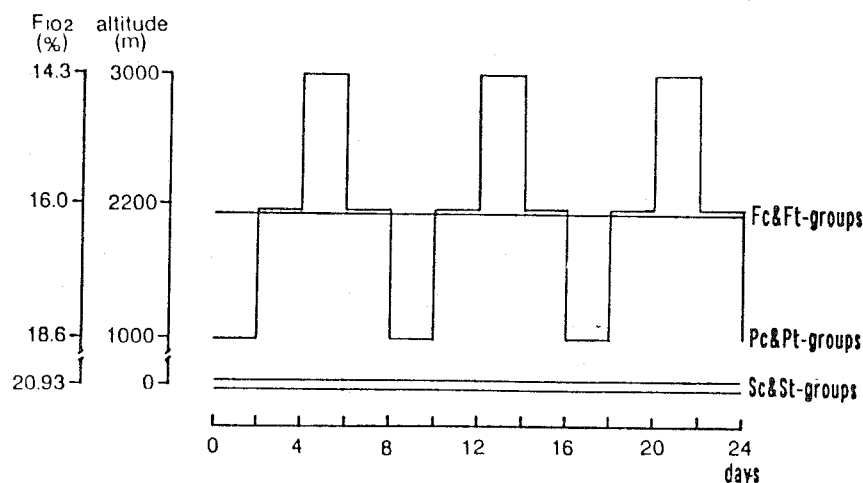


Fig. 1. Experimental design of environment and training. Sc ; control group at sea level, St ; training group at sea level, Fc ; control group at fixed hypoxic environment, Ft ; training group at fixed hypoxic environment, Pc ; control group at periodically changing hypoxic environment, Pt ; training group at periodically changing hypoxic environment,  $F_{\text{IO}_2}$  ; % $\text{O}_2$  in inspired gas.

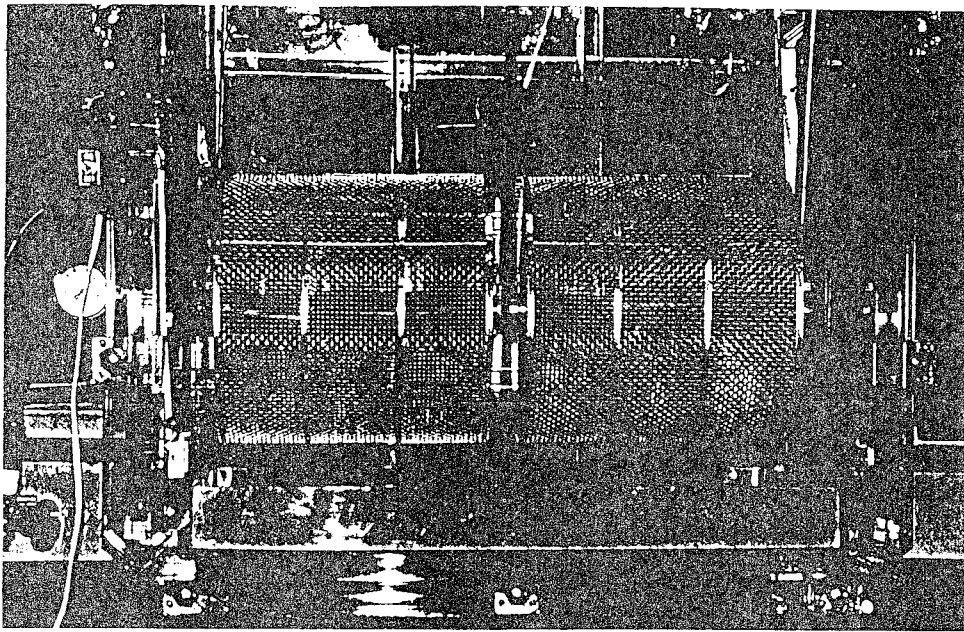
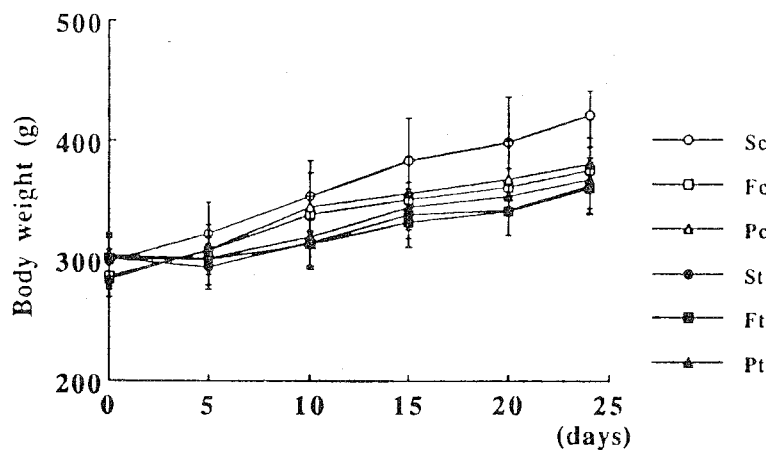


Fig. 2. Hypoxic chamber with a motor-driven wheel.

Fig. 3. Changes in body weight. Each point represents mean  $\pm$  SD.

脊を施し, 右ヒラメ筋に2%濃度の nuclear yellow を  $10 \mu\text{l}$  注入した. 24時間後, ペントバルビタール麻酔下で脊椎腰膨大部および両ヒラメ筋を摘出した. 組織は, 直ちに液体窒素で冷却し, 脊椎からはクリオスタットを用いて厚さ  $10 \mu\text{m}$  の連続切片を作成した. 蛍光顕微鏡下 ( $360 \text{ nm}$ ) で支配運動ニューロンを同定し, その後 succinate dehydrogenase (SDH) 染色<sup>4)</sup>を施した. 運動ニューロンの細胞面積および酸化系酵素活性の定量については, Ishihara たち<sup>12)</sup>の方法を用いた.

右ヒラメ筋については, 組織化学的分析のためにクリオスタットで厚さ  $10 \mu\text{m}$  の連続切片を作

成し, SDH 染色<sup>21)</sup>ならびに ATPase 染色<sup>22)</sup>を施した. Peter たち<sup>23)</sup>の方法により筋線維を fast-twitch oxidative glycolytic (FOG) 線維, slow-twitch oxidative (SO) 線維の2タイプに分類した. また, 左ヒラメ筋からは, 酵素化学的分析としてグリコーゲン量<sup>38)</sup>および SDH 活性<sup>26)</sup>を測定した.

### III. 結 果

#### A. 体重および筋重量

各群の体重の変化を Fig. 3 に, 筋重量の比較を Table 1 に示した. トレーニング開始15日目より

Tabel 1. Muscle weight

	(g)	(g/100 g body weight)
Sc	0.17±0.01	0.040±0.005
Fc	0.14±0.03	0.037±0.007
Pc	0.14±0.03	0.038±0.010
St	0.15±0.02	0.042±0.005
Ft	0.13±0.02	0.037±0.006
Pt	0.14±0.01	0.038±0.001

Values are means±SD.

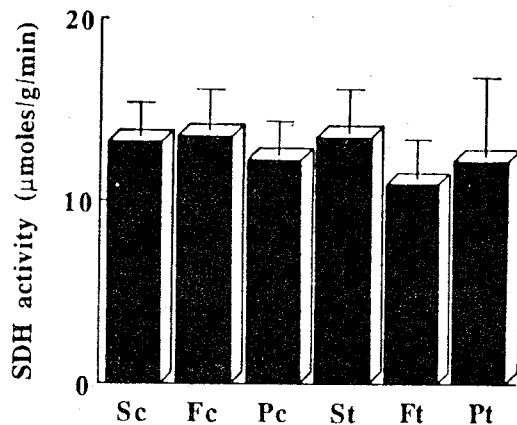
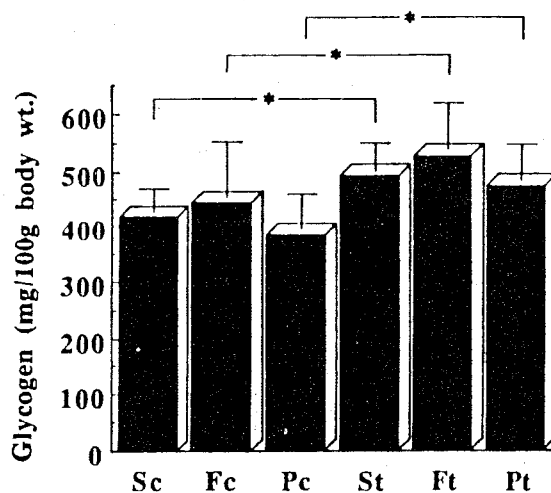


Fig. 4. Succinate dehydrogenase activity of the soleus muscle. Values are means±SD.

Fig. 5. Glycogen content of the soleus muscle. Values are means±SD. \*Significantly different ( $p < 0.05$ ).

トレーニング期間終了時まで低酸素負荷群 (Fc, Pc), トレーニング負荷群 (St, Ft, Pt) に体重増加の抑制が認められた。しかしながら, Fc, Pc, St, Ft, Pt 群間に有意な差は認められなかった。

筋重量については, 絶対値で Sc 群に比べて他 5 群に減少傾向が認められたが, 体重当りの筋量では各群間で差は認められなかった。

### B. SDH 活性およびグリコーゲン量

各群の SDH 活性およびグリコーゲン量の比については, それぞれ Fig. 4 と 5 に示した。SD 活性は, 各群間で低酸素およびトレーニングによる変化は認められなかった。また, グリコーゲン量は, St, Ft, Pt 群にトレーニングによる増加が認められたが, 低酸素環境による影響は認められなかった。

### C. 筋線維構成比

各群のヒラメ筋の筋線維構成比について Table 2 に示した。非運動群では, Pc 群に FO 線維の増加と SO 線維の減少傾向が認められたが, 有意な変化ではなかった。しかしながら, I 群で FOG 線維の有意な増加と SO 線維の有意減少が認められた。

Table 2. Muscle fiber type composition(%)

	FOG	SO
Sc	17.4±8.70	82.6
Fc	19.7±4.20	80.3
Pc	24.3±9.10	75.7
St	16.8±3.04	83.3
Ft	14.7±4.20	85.3
Pt	26.6±8.91*	73.4

Values are means±SD. \*Significantly different from St-group ( $p < 0.05$ ). FOG; fast-twitch oxidative glycolytic. SO; slow-twitch oxidative.

Table 3. Oxidative potential of the soleus neuron pool

	Alpha+Gamma	Alpha ( $\geq 491 \mu\text{m}^2$ soma area)
Sc	0.68±0.08	0.66±0.07
Fc	0.69±0.03	0.66±0.04
Pc	0.66±0.05	0.64±0.05
St	0.67±0.07	0.65±0.07
Ft	0.68±0.08	0.66±0.08
Pt	0.69±0.07	0.67±0.07

Values are means±SD.

#### D. 運動ニューロンの酸化系酵素活性

各群の運動ニューロンの酸化能力については Table 3 に示した. 細胞横断面積が  $491 \mu\text{m}^2$  以上の運動ニューロンを  $\alpha$  運動ニューロンとした. 運動ニューロンの酸化能力には各群間で差は認められなかった.

### IV. 考 察

本研究では, 変動低酸素環境下での非運動群, 運動群において SO 線維から FOG 線維の組織化学的にみた筋線維タイプの移行が認められた. この結果は, 先行研究<sup>13,32)</sup>の低圧の影響と一致するものである. 低酸素暴露が筋線維のタイプ移行, 特に速筋線維の占める割合を増加させることについて, Hildebrand たち<sup>10)</sup>は, 慢性肺疾患で酸素供給が不十分な患者では速筋線維の占める割合が一般人に比べて有意に高いことを示している. また, Sundberg たち<sup>29)</sup>は, 下肢を虚血状態でトレーニングすると膝伸展動作において角速度が上昇することを報告している. これらは, 酸素供給の制限によって筋収縮速度が増加したことを示すものであり, 速筋線維の占める割合が増加したことを裏付ける一因と考えられる.

Jansson たち<sup>14)</sup>は, 身体活動トレーニングによって, 筋線維のタイプ移行, 主に遅筋線維から速筋線維へのタイプ移行が生じることを認めた. さらに, Jansson たち<sup>15)</sup>は, ヒトを用いたスプリント・トレーニングによって, 速筋線維の割合が有意に増加することを示した. このように速筋線維の割合が増加することは, 速筋線維のミオシン合成が促進されたことを意味するが, そのメカニズムについては明らかではない. Salmons and Henriksson<sup>24)</sup>によれば, tonic な筋活動の減少, また, Lømo<sup>17)</sup>によれば高頻度のインパルス活動が速筋線維のミオシンの合成を促進し, その結果, 筋線維の速い収縮特性をもたらすと述べている. サイロキシンは, 速筋線維のミオシンの合成を促進する<sup>7)</sup>が, 低酸素の甲状腺ホルモン分泌への影響は十分にわかっていない. 先行研究<sup>32)</sup>で Sympathoadrenergic 活性の上昇と速筋線維の増加の関係を示唆したが, Jansson たち<sup>15)</sup>も同様の結果

を示している. 身体活動トレーニングによって速筋線維の占める割合が遅筋線維に比べて有意に増加するという報告<sup>25,36)</sup>は, Jansson<sup>14,15)</sup>の研究を除いて他にはない. 速筋線維の割合が増加する原因としては, 筋線維への高頻度のインパルス発射が一因と考えられる. またアドレナリン作働性が一つの寄与因子になることも考えられる.

伊藤たち<sup>13)</sup>は, 慢性的な低圧暴露によって平均直径  $25 \sim 45 \mu\text{m}$  の中型運動ニューロンで酸化系活性水準が有意に増加したことを報告している. また, Suzuki たち<sup>30)</sup>は, ラットに持続的な運動を負荷することにより, さらに Ishihara たち<sup>11)</sup>, Taguchi たち<sup>32,34)</sup>は, 低圧性低酸素へ暴露することにより, 筋線維の酸化系酵素活性の増大と酸化能力の高い筋線維の割合の増加を認め, 同様に支配運動ニューロンにおいても酸化能力の増大を報告している. しかしながら, 本研究では Pt 群において FOG 線維の増加と SO 線維の減少が認められたが, 筋中の SDH 活性および支配運動ニューロンの酸化系酵素活性には, 低酸素およびトレーニングによる変化はみられなかった. これは, 低酸素への暴露時間が 1 日 45 分間と短く, トレーニング強度が分速  $15.3 \text{ m}$  と低強度であったことが理由として考えられる. Young たち<sup>39)</sup>も酵素活性水準は, 慢性低圧暴露の場合と違って短期間の高地滞在の場合には変化しないと報告している. 長期間の低酸素暴露は大気圧下に比べて運動中の乳酸増加を少なくし, また, 低酸素の慢性適応によって解糖系が抑制されると考えられる. Taguchi たち<sup>33)</sup>は, 高度  $2,000 \text{ m}$ ,  $3,000 \text{ m}$ ,  $4,000 \text{ m}$  に相当する低圧環境下で 1 日 30 分の水泳トレーニングを 5 週間実施し,  $2,000 \text{ m}$  群でヒラメ筋の SDH 活性に有意な増加を認め, 最大泳続時間においても最長時間を示したと報告している. Terblanche たち<sup>35)</sup>は, この様な酸化系酵素活性の増加について, ラットを用いて筋中のクエン酸シンターゼの増加を, また, Young たち<sup>39)</sup>は, ヒトを高度  $4,300 \text{ m}$  の高地に 18 日間滞在させた際の運動中の筋グリコーゲン利用率の減少と血清 FFA 濃度およびグリセロール濃度の顕著な増加を認めている. これらの先行研究は, ある水準(中程度)

の低圧環境下でのトレーニングであるために解糖系を抑制し、酸化系の代謝を促進したものと考えられる。しかしながら、本研究でのグリコーゲン量は、固定群、変動群ともに低酸素の影響が認められず、トレーニングによる変化が観察された。Gollnick たち<sup>8,9)</sup>は、持久的トレーニングによる筋中のグリコーゲン濃度が増加することを報告している。また、先行研究<sup>19)</sup>では連続的な変動低圧環境下でのトレーニングによりヒラメ筋のグリコーゲン量に有意な増加を認め、トレーニングにより筋中の SDH 活性に増加が認められたことから、解糖系の抑制を示唆した。しかし、本研究での低酸素環境は、間欠的なものであったためトレーニングの影響だけが認められたものと思われる。宮村たち<sup>18)</sup>および島岡たち<sup>27)</sup>は、登山家を被検者として1日2時間の間欠的な低圧環境下で自転車エルゴメーター運動を負荷し、呼吸・循環系の改善を認めている。この点に関して、本研究の結果との違いは、暴露時間の長さの違いがその一因であると考えられる。また、筋線維タイプの移行についても本研究で用いた被検動物が、発育期のラットであり、低酸素、トレーニングなどのアドレナリン作働性の影響による成長抑制を受けやすい週齢であったこともその一因と考えられる。

## V. 要 約

24日間にわたる反復的に・規則的な低酸素環境下での持久的トレーニングが、ラットのヒラメ筋および脊髄運動ニューロンの組織化学的・酵素化学的特性におよぼす影響を検討した。ヒラメ筋および支配運動ニューロンの酸化系酵素活性には、各群間で差は認められなかった。筋中のグリコーゲン量は、低酸素環境に関わらず、トレーニングにより増大した。また、筋線維構成比は、変動低酸素での運動群において FOG 線維の割合に有意な増加が認められた。

(受付 平成4年2月26日)

## 引用文献

- 1) Asahina, K., Ikai, M., Ogawa, S. and Kuroda, Y. (1966): A study on acclimatization to altitude in Japanese athletes. The Effects of Altitude on Physical Performance. The Athletic Institute, pp. 111-113.
- 2) 浅野勝己(1985): 高所トレーニングの応用と効果. J. J. Sports Sci., **4**, 834-836.
- 3) 浅野勝己(1987): 無酸素登山と高所順応. J. J. Sports Sci., **6**, 119-125.
- 4) Campa, J. F. and Engel, W. K. (1970): Histochemistry of motor neurons and interneurons in the cat lumbar spinal cord. Neurology, **20**, 559-568.
- 5) Counsilman, J. E. (1966): The effect of altitude upon swimming performance. The Effects of Altitude on Physical Performance. The Athletic Institute, pp. 126-130.
- 6) 江橋 博, 小林寛道, 川原 貴(1990): 中国雲南省昆明市における陸連高地トレーニング. 体力研究, **76**, 67-70.
- 7) Fitts, R. H., Winder, W. W., Brooke, M. H., Kaiser, K. K. and Holloszy, J. O. (1980): Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. Am. J. Physiol., **238**, C15-C20.
- 8) Gollnick, P. D., Armstrong, R. B., Saubert, IV, C. W., Piehl, K. and Saltin, B. (1972): Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. J. Appl. Physiol., **33**, 312-319.
- 9) Gollnick, P. D., Armstrong, R. B., Saltin, B., Saubert, IV, C. W., Sembrowich, W. L. and Shepherd, R. E. (1973): Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. J. Appl. Physiol., **34**, 107-111.
- 10) Hildebrand, I. L., Sylvén, C., Esbjornsson, M., Hellström, K. and Jansson, E. (1991): Does chronic hypoxaemia induce transformations of fibre types? Acta Physiol. Scand., **141**, 435-439.
- 11) Ishihara, A., Taguchi, S., Itoh, M. and Itoh, K. (1990): Oxidative metabolism of the rat soleus neuron pool following hypobaric hypoxia. Brain

- Res. Bull., **24**, 143-146.
- 12) Ishihara, A., Naitoh, H., Araki, H. and Nishihira, Y. (1988) : Soma size and oxidative enzyme activity of motoneurons supplying the fast and slow twitch muscles in the rat. *Brain Res.*, **446**, 195-198.
  - 13) 伊藤一生, 伊藤 稔, 田口貞善, 石原昭彦(1988) : 低圧暴露によるラットヒラメ筋線維および脊髄運動ニューロンの総数, 組織化学的特性の変化. *日生誌*, **50**, 163-168.
  - 14) Jansson, E., Sjödin, B. and Tesch, P. (1978) : Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. A sign of fibre type transformation? *Acta Physiol. Scand.*, **104**, 235-237.
  - 15) Jansson, E., Sbjornsson, M., Holm, I. and Jacobs, I. (1990) : Increase in the proportion of fast-twitch muscle fibres by sprint training in males. *Acta Physiol. Scand.*, **140**, 359-363.
  - 16) 川原 貴(1991) : 日本陸連での取り組み—長距離・マラソンの高地トレーニング—. *臨床スポーツ医学*, **8**, 598-606.
  - 17) Lømo, T. (1986) : Neural regulation of membrane and contractile properties of rat skeletal muscles. *Biochemistry of Exercise*, vol. 16, Human Kinetics Publishers, pp. 27-47.
  - 18) 宮村実晴, 桜井伸二, 島岡みどり, 松井秀治, 森 滋夫, 高林 彰, 御手洗玄洋(1983) : 間欠的低酸素暴露が最大および最大下運動時の換気応答に及ぼす影響. *環研年報*, **34**, 25-28.
  - 19) 森井秀樹, 山崎先也, 石原昭彦, 岡本 啓, 田口貞善(1992) : 変動低圧環境下での飼育およびトレーニングがラット骨格筋の組織化学的・生化学的特性に与える影響. *登山医学*, **12**(印刷中)
  - 20) 武藤芳照, 宮下充正, 渡部厚一(1991) : 水連での取り組み. *臨床スポーツ医学*, **8**, 610-615.
  - 21) Nachlas, M. M., Tsou, K., DeSouza, E., Cheng, C. and Seligman, A. M. (1957) : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, **5**, 420-436.
  - 22) Padykula, H. A. and Herman, E. (1955) : The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.*, **3**, 170-195.
  - 23) Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A. and Stempel, K. E. (1972) : Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, **11**, 2627-2633.
  - 24) Salmons, S. and Henriksson, J. (1981) : The adaptive response of skeletal muscle to increased use. *Muscle Nerve*, **4**, 94-105.
  - 25) Saltin, B., Nazar, K., Costill, D. L., Stein, E., Jansson, E., Essen, B. and Gollnick, P. D. (1976) : The nature of the training response : peripheral and central adaptations to one-legged exercise. *Acta Physiol. Scand.*, **96**, 289-305.
  - 26) Shepherd, R. E., Sembrowich, W. L., Green, H. E. and Gollnick, P. D. (1977) : Effect of physical training on control mechanisms of lipolysis in rat fat cell ghost. *J. Appl. Physiol.*, **42**, 884-888.
  - 27) 島岡 清, 森 滋夫, 高林 彰, 山本正嘉, 原 真 (1984) : 高所登山のための低圧トレーニング—ダウラギリ1峰登山隊の場合—. *総合保健体育科学*, **7**, 91-98.
  - 28) 島岡 清(1991) : 高所登山法の変遷. *J. J. Sports Sci.*, **10**, 96-100.
  - 29) Sundberg, C. J., Magnusson, G., Göransson, H. and Kaijser, L. (1991) : The influence of ischemic training on the force-velocity relationship and cross sectional area of human skeletal muscle. *Proceeding of the 8th International Biochemistry of Exercise Conference*, p. 78.
  - 30) Suzuki, H., Tsuzimoto, T., Ishiko, T., Kasuga, N., Taguchi, S. and Ishihara, A. (1991) : Effect of endurance training on the oxidative enzyme activity of soleus motoneurons in rats. *Acta Physiol. Scand.*, **143**, 127-128.
  - 31) 田口貞善(1985) : 骨格筋の組織化学的・酵素化学的特性に及ぼす低圧とトレーニングの影響. 昭和59年度科学研究費補助金研究成果報告書.
  - 32) Taguchi, S., Hata, Y. and Itoh, K. (1985) : Enzymatic responses and adaptations to swimming training and hypobaric hypoxia in postnatal rats. *Jpn. J. Physiol.*, **35**, 1023-1032.
  - 33) Taguchi, S., Hata, Y. and Itoh, K. (1988) : Biochemical adaptation and trainability in swim-

- ming in rats at various high altitude levels. *Higt-Altitude Medical Science*, pp.214-220.
- 34) Taguchi, S., Ishihara, A., Itoh, M. and Itoh, K. (1990) : Effects of hypobaric hypoxia on the oxidative capacity of the extensor digitorum longus motor units in the rat. *Neurochem. Res.*, **15**, 923-926.
- 35) Terblanche, S. E., Groenewald, J. V., van Der Linde, A., Wolfswinkel, J. M., Jooste, P. L. and Oelofsen, W. (1984) : A comparative study on the effect of training at altitude and at sea level on endurance and certain biochemical variables. *Comp. Biochem. Physiol.*, **78 A**, 21-26.
- 36) Thorstensson, A., Sjödín, B. and Karlsson, J. (1975) : Enzyme activities and muscle strength after "sprint training" in man. *Acta Physiol. Scand.*, **94**, 313-318.
- 37) 塚原克己(1991) : 日本のスポーツ界における「高地トレーニング」の歴史と今後の課題. *臨床スポーツ医学*, **8**, 593-597.
- 38) van Handel, E. (1965) : Estimation of glycogen in small amounts tissue. *Anal. Biochem.*, **11**, 256-265.
- 39) Young, A. J., Evans, W. J., Cymerman, A., Pandolf, K. B., Knapik, J. J. and Maher, J. T. (1982) : Sparing effect of chronic high-altitude exposure on muscle glycogen utilization. *J. Appl. Physiol.*, **52**, 857-862.